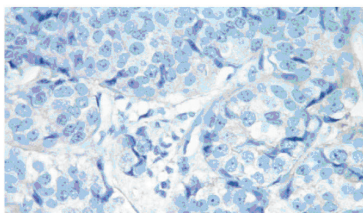
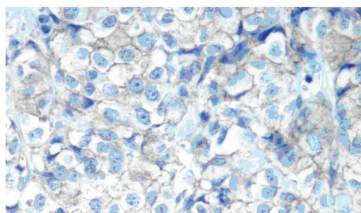


Сазонов С.В.

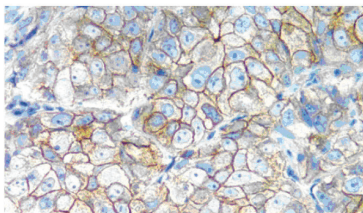
**ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА  
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ  
ИНВАЗИВНОГО РАКА  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**



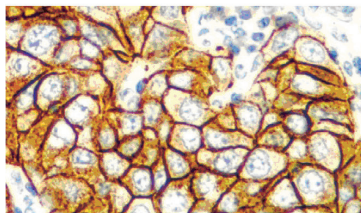
Score: 0 (40x)



Score: 1+ (40x)



Score: 2+ (40x)



Score: 3+ (40x)

Екатеринбург  
2018

УДК 616-092.18

ББК 52.5

Сазонов С.В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы / Екатеринбург, ВУМАН, 2018. – 152 с.

Sazonov S.V. Ensuring the quality of molecular biological studies in the diagnosis of breast cancer / Ekaterinburg, VUMAN, 2018. – 152 p.

#### **Рецензенты:**

**Ястребов А.П.** — Заслуженный деятель науки РФ, член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор

**Леонтьев С.Л.** — главный врач ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий доктор медицинских наук, профессор

**Демидов С.М.** — доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой онкологии и медицинской радиологии УГМУ МЗ РФ, член президиума РООМ

В монографии обобщен опыт работы региональной референсной лаборатории УрФО РФ по молекулярно-генетической диагностике рака молочной железы. Дана комплексная оценка процессов, влияющих на качество молекулярно-генетической диагностики рака молочной железы в патоморфологической лаборатории. Показано, что постоянный внутри лабораторный контроль качества проводимых молекулярно-генетических исследований является одним из наиболее важных факторов, гарантирующих качество работы отдельной взятой лаборатории. Система внешнего контроля качества дает возможность объективно оценить результаты работы разных лабораторий, определить причину выявленных несоответствий и дать рекомендации по их устранению. Разобраны основные шаги иммуногистохимической диагностики рака молочной железы, этапы организации работы региональной референсной лаборатории.

Издание представляет интерес для широкого круга врачей, гистологов, врачей патологоанатомов, научных сотрудников, биологов, аспирантов, студентов медицинских вузов и биологических факультетов университетов.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» в качестве монографии (протокол № 4 от 05.06.2018 г.).

ISBN: 978\_5\_9908479\_6\_5

© ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, 2018;

© ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, 2018;

© Сазонов С.В., 2018

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ  
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский  
университет»  
ГАУЗ СО «Центр специализированных видов медицинской  
помощи «Институт медицинских клеточных технологий»

Сазонов С.В.

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА  
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ПРИ ДИАГНОСТИКЕ  
ИНВАЗИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Екатеринбург, Россия  
2018

## СОДЕРЖАНИЕ:

Глава 1. Актуальность проблемы .....	
1.1. Основные понятия .....	
1.2. Роль патологической анатомии в диагностике рака молочной железы на современном этапе.....	
1.3. Прогностические факторы при раке молочной железы.....	
Глава 2. Проведение патологоанатомического исследования инвазивного рака молочной железы .....	
2.1. Порядок оформления направления на патологоанатомическое исследование .....	
2.2. Этапы гистологического исследования материала .....	
2.3. Особенности исследования биопсийного материала (трепанобиопсия).. ..	
2.4. Исследование операционного материала .....	
2.4.1. Тип материала .....	
2.4.2. Количество обнаруженных опухолевых узлов .....	
2.4.3. Расположение опухолевого узла .....	
2.4.4. Размер наибольшего опухолевого узла .....	
2.4.5. Гистологическая форма рака .....	
2.4.6. Степень злокачественности инвазивного рака по Ноттингемской системе .....	
2.4.7. Наличие рака in situ.....	
2.4.8. Наличие лимфоваскулярной инвазии.....	
2.4.9. Наличие инвазии в кожу и скелетные мышцы .....	
2.4.10. Расстояние до ближайшего края препарата (края резекции) .....	
2.4.11. Поражение лимфатических узлов .....	
2.4.12. Лечебный патоморфоз .....	
2.4.13. Стадирование по pTNM .....	
Глава 3. Иммуногистохимические (иммуноморфологические) исследования .....	
3.1. Основные понятия иммуногистохимии.....	
3.2. Требования к патоморфологической лаборатории, занимающейся иммуногистохимией .....	
3.3. Постановка иммуногистохимического исследования (рекомендуемый протокол) .....	



3.4. Иммуногистохимическая диагностика рака молочной железы .....	
3.4.1. Постановка иммуногистохимического исследования Estrogen и Progesterone Receptor (рекомендуемый протокол).....	
3.4.2. Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии клетками HER2 neu (рекомендуемый протокол) .....	
3.4.3. Постановка иммуногистохимического исследования Ki-67 (рекомендуемый протокол).....	
3.5. Определение подтипа рака молочной железы.....	
Глава 4. Организация работы системы пересмотра материала пациенток с раком молочной железы (референс) .....	
4.1. Основные принципы организации системы референса рака молочной железы .....	
4.2. Материалы и методы .....	
4.3. Схема проведения молекулярно-биологических исследований рака молочной железы .....	
4.4. Результаты внедрения системы референсных исследований.....	
4.5. Основные шаги по улучшению качества проведения иммуногистохимических исследований в лабораториях первого просмотра материала .....	
4.6. Наиболее распространенные ошибки лабораторий первого просмотра, выявленные при внедрении системы референсных исследований .....	
Заключение .....	
Литература .....	
Приложения .....	

# Глава 1. Актуальность проблемы

Лидером в структуре смертности женского населения среди онкологических заболеваний в настоящее время является рак (карцинома) молочной железы (РМЖ). При этом постановка диагноза — необходимое условие успешного лечения любого злокачественного новообразования. Диагноз рака молочной железы основан на комбинации данных клинического обследования, патоморфологических и молекулярно-биологических исследований и методов лучевой диагностики, которые предоставляют врачу прогностические данные, необходимые для назначения лечения. Особенности организации высокотехнологичной диагностической помощи данной категории больных на современном этапе и посвящена эта монография. Основным приоритетом монографии является представление тех наработок, имеющегося опыта, которые имеются сегодня и признаны как эффективные модели организации помощи больным раком молочной железы на международном уровне, так и на уровне субъекта Российской Федерации — Уральского федерального округа.

## 1.1. Основные понятия

**Основная цель диагностики** рака молочной железы — наиболее точно дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования молочной железы, инвазивный и неинвазивный рак, определить основные прогностические и предективные факторы для своевременного назначения соответствующего вида лечения.

**Патоморфологический диагноз** — это диагноз, поставленный на основании изучения микроскопических характеристик клеток и тканей, которые позволяют правильно определить гистологический тип опухоли. Именно интерпретация микроскопических находок составляет сегодня окончательный диагноз, является «последним словом».

### **Система качества в патологической анатомии**

Важна не только доступность диагностического метода, но и уровень, компетентность его выполнения. Это означает, что в результате его применения ставится правильный диагноз, а врачи, проводящие лечение, уверены в полученных данных. Качество проводи-

мых медицинских услуг в патолого-анатомическом отделении связано с наличием в лаборатории элементов внутреннего и внешнего контроля. Важнейшим элементом внешнего контроля является система пересмотра материала в референс-лаборатории. В мировой практике первая система внешнего контроля качества UKNEQAS была создана в Великобритании в 1985 г. Позднее принцип обязательного пересмотра материала опухолей разными патологами и лабораториями стал внедряться и в других странах [Криволапов и др. 2011]. Внедрение системы референса вплотную приближает Российские патолого-анатомические отделения, участвующие в ней, к созданию в их работе условий, соответствующих требованиям ISO 15189:2003, ГОСТР ИСО-2006 «Медицинские лаборатории. Специальные требования к качеству и компетентности».

**Референс** — пересмотр патолого-анатомического материала в отделении, имеющего статус референс-лаборатории.

**Референс-система** — это набор организационных, структурных и финансовых решений, направленных на создание и поддержания механизма пересмотра патолого-анатомического материала с целью обеспечения качества выполняемых исследований в отделениях, входящих в эту систему [Сазонов и др., 2011, 2015].

**Лаборатория первого просмотра** — это патолого-анатомическое отделение, обеспечивающее диагностику в данном лечебном учреждении и имеющая соответствующую лицензию на данный вид медицинской деятельности. Данная лаборатория обеспечивает объем диагностики в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи и объемом ее финансирования. Обязательным для включения в референс-систему является наличие специальных дополнительных методов исследования и минимальный объем исследований, выполняемых в течение года [Сазонов и др., 2011, 2013, 2015]. В соответствии с основными требованиями, сформулированными в 2010 г. ASCO/CAP для обеспечения нормальной организации работы современной лаборатории молекулярно-биологических методов исследования рекомендуемое минимальное количество исследований в год должно составлять не менее: для иммуногистохимических (ИГХ) исследований — 250 исследований, для FISH — 100 исследований.

**Лаборатория второго просмотра** — отделение, в котором осуществляется пересмотр материала, поступающего из лабораторий первого просмотра. Такая лаборатория должна не только иметь лицензию на осуществление специализированной медицинской помощи по патологической анатомии, но и пройти добровольную процедуру сертификации процессов выполнения патолого-анатомических исследований и патолого-анатомических услуг в здравоохранении в статусе референс-лаборатории, в том числе на выполнение патогистологических, морфометрических, иммуноморфологических и ISH исследований и получить соответствующий Сертификат соответствия (см. Приложение). Т.о. в референс-лаборатории должна быть возможность выполнения всего спектра молекулярно-биологических методов исследования. При этом объемы выполняемых такой лабораторией исследований должны быть не меньшими, чем рекомендуемые ASCO/CAP. В такой большой по территории стране как Россия, референс-лаборатория второго просмотра обычно осуществляет свою деятельность в субъекте федерации (республике, федеральном округе, столице Федерального округа, областном центре и т.д.). Сотрудники референс-лаборатории второго просмотра являются наиболее квалифицированными специалистами в данном разделе патологической анатомии, занимаются работой по обучению, оказания методической помощи специалистам лабораторий первого просмотра, входящим в референс-систему [Сазонов и др., 2011].

**Центральная референс-лаборатория** — отделение, в котором осуществляется пересмотр материала, поступающего из региональных референс-лабораторий второго просмотра. Такая лаборатория имеет лицензию на осуществление специализированной медицинской помощи по патологической анатомии и Сертификат соответствия процессов выполнения патолого-анатомических исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении в статусе референс-лаборатории, в том числе на выполнение патогистологических, морфометрических, иммуноморфологических и ISH исследований. Сотрудники Центральной референс-лаборатории являются наиболее квалифицированными специалистами в данной области в России, активно занимаются научно-исследовательской работой, являются признанными профессиональным сообществом авторитетами, специалистами в данном направлении деятельности, проводят работу по обучению, оказанию консультативной и методической

помощи специалистам лабораторий, входящим в референс-систему.

## **1.2. Роль патологической анатомии в диагностике рака молочной железы на современном этапе**

Постановка диагноза «рак молочной железы» сегодня имеет не только чисто диагностическое, но и прогностическое и терапевтическое значения, которые существенно влияют на сохранение и качество жизни пациентки. Экспертная группа BHGI настоятельно рекомендует, чтобы у всех женщин с подозрением на рак молочной железы перед началом специального лечения происходила верификация диагноза с помощью патоморфологических исследований. Это относится и к женщинам с клиническими проявлениями, с высокой вероятностью указывающими на злокачественный характер образования. Патолого-анатомической диагностикой нельзя пренебрегать, поскольку неправильный диагноз может приводить к назначению ошибочного лечения, что может ухудшить результаты лечения, качество ее жизни и расточительно с точки зрения неэффективного дальнейшего использования материальных и финансовых ресурсов системы здравоохранения.

Основное назначение проведения патолого-анатомических исследований при заболеваниях молочной железы на современном этапе это не только своевременная и точная диагностика, но и получение дополнительных сведений об опухоли с использованием новых молекулярно-биологических методов. При этом крайне важными становятся соблюдение протоколов методик забора и оптимальной обработки материала для патолого-анатомических исследований и компетентная интерпретация макро- и микроскопических находок. Эффективная работа патолого-анатомической службы требует своевременного, точного и всестороннего представления полученных данных, хранения стекол и блоков, а также точной идентификации пациентов и их материала.

Интерпретация микроскопических находок сегодня должно определять окончательный диагноз — заключение патологоанатома безусловно должно являться «последним словом». Без заключения патологоанатома недопустимо в настоящее время назначать пациентке лечение. В то же время, независимо от метода получения материала для патолого-анатомического исследования безусловно его результаты должны быть сопоставлены с другими данными, в том числе с клиническими находками и данными методов визуализации, чтобы оценить их соответствие. Ключом к постановке точного

диагноза является правило «тройного исследования»: если клинические данные, результаты методов визуализации или и то, и другое крайне подозрительны в отношении рака молочной железы, а при патоморфологическом исследовании выявляют доброкачественную патологию, результат патоморфологического исследования считается противоречащим другим данным. В этом случае, для того чтобы поставить окончательный диагноз необходимо выполнить повторную биопсию.

Внедрение программы диагностики рака молочной железы требует значительно большие материальные ресурсы, чем необходимые просто для выполнения только пункции или биопсии и интерпретации их результатов. Эта программа должна быть интегрирована в комплексную систему, адресованную другим участникам диагностического процесса и лечащему врачу. Так, например, должны иметься надежные отработанные механизмы маркировки и транспортировки материала, занесения результатов патоморфологического исследования в медицинскую документацию пациентки и сообщения его результатов лечащему врачу.

Диагностика включает в себя как постановку диагноза (позволяет определить наличие или отсутствие рака молочной железы), так и определение стадии развития злокачественной опухоли у конкретной пациентки [Sobin et al., 2002, Пальцев и др., 2011].

Существует ряд подходов к получению гистологического материала для патоморфологических исследований при образованиях молочной железы с целью диагностики злокачественной опухоли. При правильном использовании и проведении манипуляции они имеют сравнимую точность. В целом методы получения материала для патоморфологических исследований, позволяющие надежно диагностировать рак молочной железы, можно разделить на две группы:

- 1) минимально инвазивные, или пункционные (пункция образования с целью получения материала для цитологического исследования и пункционная биопсия),

- 2) хирургические (открытая, или инцизионная биопсия).

Выбор методов получения материала для патоморфологических исследований в условиях лечебного учреждения, в котором находится лаборатория превичного просмотра, зависит от ряда факторов, таких как доступность необходимого оборудования и наличия опыта у персонала [Vargas et al., 2003].

При пальпируемых образованиях иглу в большинстве случаев можно вводить под контролем пальпации, в других случаях ее мож-

но вводить под контролем методов визуализации. **Пункция** с целью получения материала для цитологического исследования подразумевает получение клеточного материала с помощью тонкой (22-25 G) иглы [Vargas et al., 2003]. К преимуществам этого метода относится то, что он наименее инвазивный и наименее дорогой. Среди недостатков следует отметить необходимость наличия персонала, обученного получению материала, проведению цитологического исследования ткани молочной железы и интерпретации его результатов, малый объем материала, что затрудняет дальнейшее использование дополнительных методов исследования и трудности интерпретации атипичных клеток при пограничной патологии, а также умеренно высокую частоту неинформативных образцов. Последняя составляет по данным литературы, около 30% [Chaiwun et al., 2002, Pisano et al., 2001] и может быть снижена за счет одномоментного проведения нескольких (например 5 и более) пункций [Vargas et al., 2003].

Для получения материала для патоморфологических исследований образований молочной железы, особенно непальпируемых и выявленных методами визуализации, широко используется также **пункционная биопсия** [Meunier et al., 2002]. При пункционной биопсии образец тканей получают с помощью режущей иглы (обычно 14 G) и биопсийного пистолета. Получение множественных (например, 3-5) образцов увеличивает вероятность точного диагноза. Однако, как и при пункции с целью получения материала для цитологического исследования, успех этой процедуры зависит от отбора пациенток, наличия опытного врача-патологоанатома и сопоставления данных гистологического исследования и информации, полученной при клиническом обследовании и с помощью методов визуализации. Недостатки пункционной биопсии аналогичны недостаткам пункции с целью получения материала для цитологического исследования. В первую очередь это небольшой объем получаемого материала и часто возникающие трудности интерпретации атипичных клеток и пограничной патологии [Hoda et al., 2005].

Традиционным же методом получения материала для патоморфологических исследований при объемных образованиях молочной железы до сих пор остается **открытая биопсия**. Открытая биопсия позволяет получить материал для проведения гистологического и дополнительных методов исследования, т.е. предоставляет наибольшую информацию. Недостатки открытой биопсии — инва-

живный характер и значительная стоимость, если биопсию выполняют в операционной. При выполнении в амбулаторных условиях стоимость открытой биопсии существенно снижается [Green et al., 2004].

Еще раз нужно подчеркнуть, что точный патолого-анатомический диагноз начинается с клинициста, который должен предоставить врачу-патологоанатому соответствующие данные проведенных клинических исследований. Необходимость тройного исследования с целью сведения к минимуму числа диагностических ошибок особенно важна при использовании минимально инвазивных методов получения материала для патоморфологических исследований [Vargas et al., 2004].

### **1.3. Прогностические факторы**

Прогностические факторы сегодня чрезвычайно важны при планировании лечения рака молочной железы. Некоторые клинические, патоморфологические и биологические особенности опухоли позволяют оценить вероятность эффективности определенного метода лечения [Allred et al., 1998]. Такие параметры, как:

- 1) размер опухоли,
- 2) состояние региональных лимфатических узлов,
- 3) гистологический тип опухоли,
- 4) степень злокачественности опухоли,
- 5) оценка состояния краев резекции,
- 6) состояние сторожевого лимфатического узла, наличие метастазов,

необходимо документировать обязательно, поскольку их определение недорого, а прогностическая ценность достаточно высокая [Quiet et al., 1996, Page et al, 1998, Pinder et al.,1994, Vargas et al., 2003, 2004, Франк и др. 2013]. Эти характеристики полезны для лечащего врача и при определении прогноза течения заболевания.

## **Глава 2. Проведение патологоанатомического исследования инвазивного рака молочной железы**

### **2.1. Порядок оформления направления на патологоанатомическое исследование**

В направлении операционного и биопсийного материала на патологоанатомическое исследование должны быть указаны следующие



щие данные:

- Идентификационный номер пациента (номер истории болезни или амбулаторной карты).
- Дата направления материала.
- Дата и время медицинской манипуляции (операции или биопсии).
- Ф.И.О.
- Пол.
- Возраст.
- Краткие анамнестические сведения, включающие информацию о наличии и длительности симптомов заболевания (пальпируемое образование, выделения из соска, втяжение соска или кожи), о предшествующих манипуляциях на молочной железе (биопсия, пластика), о системных заболеваниях (сахарный диабет, васкулиты).
- Сведения, полученные при неинвазивных методах исследования, включающие информацию о размере, количестве и локализации (по квадрантам или по циферблату часов) опухолевых узлов.
- Сведения о наличии и виде предоперационного лечения (неoadъювантная гормональная или химиотерапия, лучевая терапия).
- Наличие или отсутствие мутации генов BRCA1/BRCA2/CHEK (если исследовались).
- Характер операции (первичная или по поводу рецидива).
- Тип хирургического вмешательства (трепан-биопсия, открытая биопсия, секторальная резекция, радикальная резекция, подкожная мастэктомия, мастэктомия с или без регионарной клетчатки и мышцы).
- Тип операционного материала с указанием стороны поражения (столбики ткани, сектор молочной железы, молочная железа с или без регионарной клетчатки и скелетной мышцы).
- Если материал направляется не единым блоком, следует производить маркировку материала и отражать это в направлении.
- Клинический диагноз.
- Фамилия и подпись лица, направившего материал на исследование.

## **2.2. Этапы гистологического исследования материала**

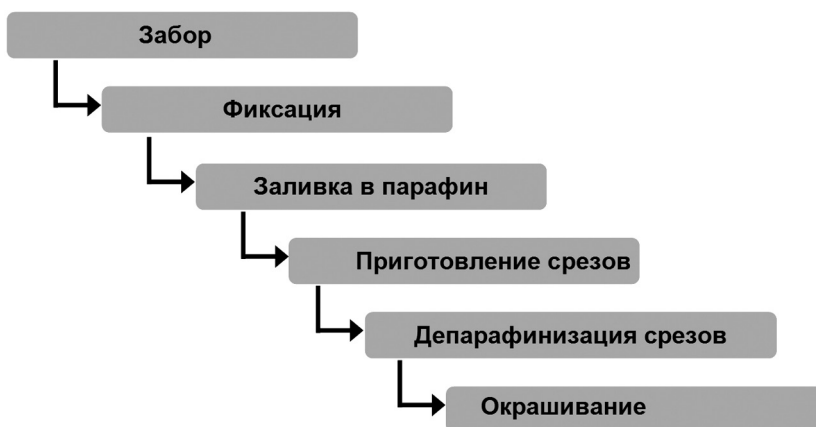
В настоящее время «золотым стандартом» исследования рака молочной железы является проведение гистологического исследования, с определением основных шести параметров, указанных выше

и молекулярно-биологических характеристик опухоли, к которым относятся: определение экспрессии уровней рецепторов к эстрогену, прогестерону, HER2 neu и уровня активности пролиферативных процессов по степени экспрессии регуляторного белка Ki 67 опухолевыми клетками в ткани [Франк и др., 2011].

ИГХ оценка уровня эстрогеновых или прогестероновых рецепторов либо и тех, и других целесообразна только в том случае, если в соответствующем лечебном учреждении возможна последующая гормонотерапия (назначение тамоксифена, ингибиторов ароматазы, хирургическое или медикаментозное выключение функции яичников). В то же время, внедрение исследования ИГХ экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов и HER-2/neu, рекомендуется уже в лаборатории первого просмотра. Повторное проведение исследования экспрессии HER-2/neu, особенно с неясным уровнем экспрессии 2+ (т.к. стоимость иммуногистохимического исследования, флюоресцентной гибридизации *in situ* и лечения трастузумабом в условиях ограниченных ресурсов достаточно высока), в настоящее время рекомендуется только в лаборатории второго просмотра материала [Anderson B.O., et al., 2006, Сазонов и др., 2011, 2015].

На уровне лаборатории первого просмотра материала сегодня могут быть обеспечены все основные компоненты «Золотого стандарта» диагностики рака молочной железы. Кроме того, от качества проведенной работы первичной лабораторией в большой степени зависит дальнейшая реализация диагностической программы пациентки. Нарушения технологии забора, проводки гистологического материала приводят к невозможности получения достоверных результатов при проведении дополнительных методов, таких как ИГХ или молекулярно-биологические исследования. При этом последние не требуют соблюдения каких-то принципиально новых правил обработки материала, а только требуют неукоснительного выполнения схем уже существующих методик. В рекомендациях ASCO/CAP к патоморфологической лаборатории за 2015 г. это звучит как «Использование стандартизованных процедур обработки материала». В обработку материала входит несколько этапов, каждый из которых может оказать влияние на результаты проводимых исследований. Принципиальная схема этапов обработки показана на рис.1.

Рассмотрим процедуры, необходимые для проведения на основных этапах и возможные ошибки, наиболее часто встречающиеся при их выполнении.



*Рис.1. Этапы обработки гистологического материала в лаборатории первичного просмотра.*

**Этап: Забор материала.** Этап выполняется сертифицированным врачом (хирургом, эндоскопистом и др.). На этом этапе очень важно, чтобы врач бережно относился к полученному материалу. Должны быть использованы острые инструменты, полученные кусочки не должны сдавливаться пинцетом и т.д. Материал не должен находиться вне фиксатора, недопустимо его подсыхание. Оптимальной является ситуация, когда биопсийный материал сразу же после его забора вырезается, помещается в фиксирующий раствор и заполняется направление на патолого-анатомическое исследование. В том случае, если последующая работа с материалом осуществляется в гистологической лаборатории, то последний должен быть доставлен не позднее чем в течение 20 минут. В этом случае материал подписывается, вырезается и фиксируется уже непосредственно в лаборатории.

Нужно предупредить лечащего доктора, что:

1. Если планируется последующее проведение специальных методов диагностики (ИГХ исследования, молекулярно-биологические исследования ISH) в этом случае должны браться операционные препараты или биоптаты рака молочной железы только до проведения лекарственного/лучевого лечения.

2. Нужно учитывать, что проведение ИГХ и ISH исследований возможно с использованием не только основного узла опухоли, но и материала в метастазах.

Последующая обработка (проводка) биопсированного материала осуществляется уже непосредственно в гистологической лаборато-

рии. При этом уровень оснащения лабораторий может существенно отличаться. Использование в работе лаборатории тканевых процессоров снимает большинство вопросов к качеству проводки материала, т.к. осуществляется по предустановленным протоколам и основное усилие сотрудников должно быть направлено на соблюдение содержания, обеспечение и аккуратное соблюдение технологии. Формально методика проводки материала принципиально не отличается при выполнении в ручном или автоматизированном варианте, в любом случае все определяют «золотые руки» лаборанта-гистолога лаборатории. В тоже время, есть некие ключевые существенные моменты, на которые следует обращать внимание для получения стабильного, воспроизводимого результата.

Осторожно нужно относиться при использовании ускоренных технологий проводки материала, которые появились в последнее время. В любом случае, прежде чем закупать, а тем более применять подобное оборудование обязательно уточните пригодность получаемого материала для проведения в последующем специальных методов исследования.

Так же недопустимым является желание ускорения процесса, сокращения времени проводки биопсийного материала путем повышения температуры растворов.

**Этап: Фиксация ткани.** Основное назначение этапа – предотвращение процессов разложения в материале и закрепление прижизненного расположения гистологических структур. Нарушение процесса фиксации — **наиболее частая ошибка** при обработке гистологического материала, которая в дальнейшем оказывает влияние на все выполняемые последующие гистологические и дополнительные исследования.

Основные правила проведения фиксации материала:

1. Время от забора материала до помещения его в фиксатор не должно превышать 30 минут.

2. Длительность фиксации:

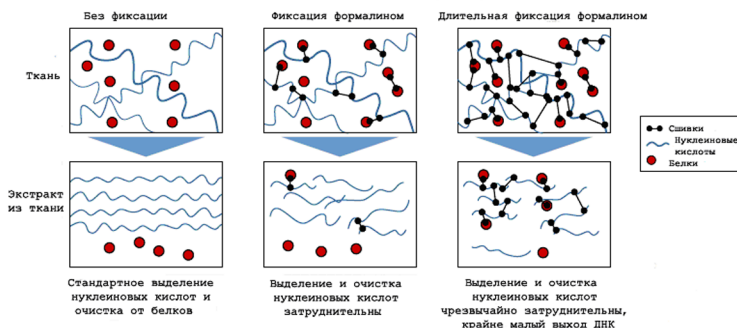
Для образцов хирургических препаратов составляет 6-48 ч. (как минимум 1 ч./1 мм. ткани);

Для биоптатов — не более 24 ч. (но как минимум 1 ч./1 мм. ткани).

3. Объем фиксатора должен в 10-20 раз превышать объем фиксируемого кусочка.

Необходимо особо обращать внимание на продолжительность времени фиксации материала. При снижении указанного выше вре-

мени фиксации материал окажется непрофиксированным, что скажется в дальнейшем даже при обычном гистологическом исследовании. Более того, в дальнейшем возникнут проблемы с хранением, архивированием такого материала из-за выраженного процесса разрушения материала в парафиновых блоках. С другой стороны недопустимо и увеличение времени фиксации, с учетом механизма действия формалина на ткани (рис. 2).



*Рис.2. Механизм воздействия формалина на нуклеиновые кислоты и белки клеток ткани при их фиксации.*

Появление сшивок между молекулами белка и цепями нуклеиновых кислот при формалиновой фиксации нарастает прямопропорционально времени фиксации, и наступающая последующая денатурация белка становится на определенном этапе необратимой. Это особо не отражается на гистологии материала при обычных окрасках, но приводит к необратимым изменениям для применения его при проведении ИГХ и ISH исследований. В первую очередь это приводит к появлению ложно-негативных случаев при проведении ИГХ исследований рака молочной железы. Не менее существенным этот момент становится при проведении полуколичественной оценки результатов иммуногистохимических реакций. В нашей лаборатории мы специально изучали вопрос динамики уровней экспрессии основных ИГХ показателей при фиксации материала рака молочной железы в 10% нейтральном формалине с использованием цитофотометрического метода исследования. Оказалось, что значительное снижение уровней экспрессии Estrogen в опухолевых клетках обнаруживается уже после 2 суток фиксации в формалине, а к 7 суткам экспрессия ни одного из изученных иммуногистохимических маркеров уже вообще не определяется (рис. 3, 4). Проведенная работа позволила нам получить косвен-

ные показатели, позволяющие оценивать качество фиксации и степень искусственных изменений материала, поступающего из лаборатории первого просмотра, что является существенным для выявления ложно отрицательных случаев при проведении ИГХ исследований.

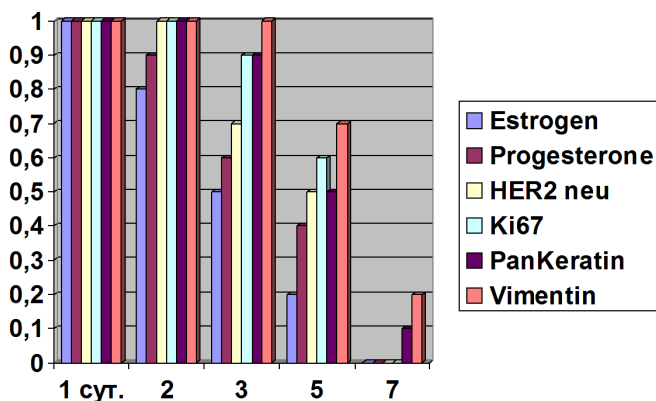


Рис.3. Динамика изменения экспрессии основных ИГХ показателей при фиксации материала РМЖ в формалине. Уровень экспрессии каждого антитела в 1 сут. принят за единицу (100%). Цитофотометрический метод.

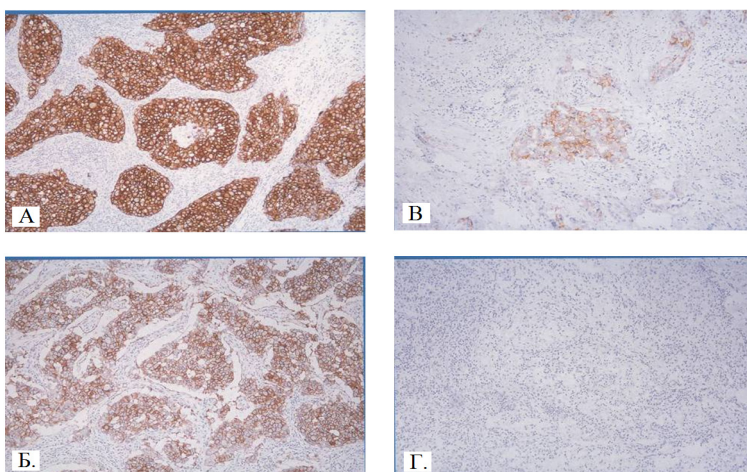


Рис 4. Влияние формалиновой фиксации на выявляемый уровень экспрессии HER2 в препарате карциномы молочной железы. ИГХ. Сроки фиксации: А. – 1 сут., Б – 3 сут., В – 5 сут., Г - 7 сут. (Препараты д.б.н. Завалишиной Л.Э.)

#### 4. Характеристика используемого фиксатора:

10% нейтральный забуференный формалин; фиксатор должен быть свежеприготовленным или закуплен готовый для использования (ready to use);

Нужно учитывать, что ИГХ и ISH исследования могут быть затруднены при использовании неформалиновых фиксаторов. Обязательно перед применением нужно уточнить у изготовителя фиксатора о возможности проведения дальнейших исследований при его использовании.

**Этап: Заливка в парафин.** Для уплотнения материала, обеспечивающее в последующем возможность изготовления тонких гистологических срезов биопсированные кусочки обычно заливают в парафин. С этой целью могут быть использованы и другие заливочные материалы, однако дешевизна парафина и его химико-физические характеристики обычно полностью устраивают патолого-анатомические лаборатории. При использовании другого заливочного материала обязательно уточните последующую возможность проведения дополнительных исследований при его применении. Предварительно биопсированные кусочки дегидратируются серией погружений в этанол/ксилен.

Основные правила, которые необходимо соблюдать при заливке:

- 1) используется только свежий парафин;
- 2) температура расплавленного парафина не должна превышать 56°C;
- 3) необходимо избегать длительного нахождения материала в расплавленном парафине, поскольку при высокой температуре могут повреждаться клеточные антигены;
- 4) оптимальный размер стороны среза формируемого в результате заливки парафинового блока должен составлять около 1 см<sup>2</sup>.

При заливке в парафин в настоящее время желательно использовать стандартные заливочные кольца или одноразовые кассеты, что значительно упрощает работу в дальнейшем лаборанта-гистолога, в том числе и в референс-лаборатории.

Следует помнить о некоторых базовых принципах при исследовании биопсийного материала.

- При заливке в парафин все столбики ткани следует размещать в заливочной форме отдельно и в одной плоскости.
- Не следует помещать более пяти столбиков ткани в один блок.
- Окраска гематоксилином и эозином является обязательной при



исследовании трепан-биоптата.

- Необходимо исследовать столбики ткани на разных уровнях, например, приготовить два среза с интервалом 25 мкм.

Готовые парафиновые блоки, содержащие правильно фиксированный и проведенный материал можно длительно годами хранить в архиве без существенного ухудшения, изменения его свойств.

**Этап: Приготовление срезов.** Гистологические срезы должны изготавливаться с парафиновых блоков непосредственно перед проведением ИГХ исследования.

Основные правила приготовления срезов:

1. Используя гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, выбирается блок оптимальный для проведения реакций. В срезе не должно быть выраженных артификальных изменений, участков некроза опухоли, участков с плохой фиксацией ткани, желательно чтобы в материале присутствовали не только элементы опухоли, но и нормальные структуры молочной железы;

2. Толщина получаемых гистологических срезов для последующего оптимального прохождения ИГХ реакции и правильной ее оценки должна составлять около 4 мкм. Несоблюдение этого момента может при полуколичественной оценке реакции приводить к гипо- или гипердиагностике;

3. Полученные гистологические срезы помещаются на предметные стекла с нанесенным на них веществом, повышающим его адгезию (предметные стекла с нанесенным на них адгезивным полилизинным покрытием). Не рекомендуется изготавливать подобные стекла непосредственно в лаборатории, т.к. это может приводить с одной стороны к потере срезов при проведении реакции и с другой стороны к появлению фонового окрашивания;

4. Полученные гистологические препараты должны для хорошего прикрепления срезов к предметному стеклу могут быть выдержаны:

- в течение 12-24 ч. при температуре 37°C; или
- в течение 1 ч при температуре 60°C.

Несоблюдение этого правила будет приводить к частичному отрыву срезов от стекол или полной утраты материала, что будет значительно затруднять или делать интерпретацию результатов в дальнейшем невозможной.

**Этап: Депарафинизация среза.** Осуществляется в соответствии со стандартной методикой, используемой в обычной гистологии пу-



тем помещения предметных стекол со срезами последовательно в несколько смен растворов ксилол/этанола.

Основные правила депарафинизации:

1) недопустимо повышать температуру растворов выше комнатной;

2) должны использоваться только свежие растворы. Оставшийся в срезе парафин при некачественной депарафинизации будет приводить к появлению неспецифичного окрашивания ткани среза, что может отразиться на интерпретации результатов ИГХ реакций.

**Этап: Окрашивание.** Выполняется окрашивание гематоксилином и эозином и орсеином для проведения последующего гистологического исследования.

**Этап: Проведение патолого-анатомического исследования.** Гистологическое исследование осуществляется врачом-патологоанатомом при проведении световой микроскопии. При правильно выполненных заборе и вырезке материала гистологическое исследование позволяет оценить все основные параметры, интересующие лечащего врача: гистологический тип опухоли, степень злокачественности опухоли, оценка состояния краев резекции, состояние региональных лимфатических узлов, состояние сторожевого лимфатического узла. Необходимо все находки обязательно документировать, поскольку их определение недорого обходится, а прогностическая ценность достаточно высокая [Франк и соавт., 2011, Quiet et al., 1996, Page et al., 1998, Pinder et al., 1994, Vargas et al., 2004, 2005]. Эти характеристики важны для лечащего врача при определении тактики лечения и прогноза течения заболевания.

После выполнения гистологического исследования формулируется описательная часть заключения, определяются дополнительные методы исследования и выставляется патологоанатомический диагноз. РООМ рекомендует включать в протокол патоморфологического исследования биопсийного и операционного при раке молочной железы следующие разделы:

- Макроописание присланного материала.
- Микроописание взятых на исследование фрагментов ткани.
- Заключение (патологоанатомический диагноз).

### **2.3. Особенности исследование биопсийного материала (трепанобиоптата)**

В настоящее время минимально инвазивные и экономически эффективные трепан-биопсии (core needle biopsy) вытесняют открытые биопсии при диагностике поражений молочной железы. Также они более информативны, чем тонкоигольные биопсии, ибо позволяют оценить наличие инвазивного компонента и рака *in situ*, а также корректно исследовать рецепторный статус инвазивного компонента на дооперационном этапе.

С появлением толстоигольной пункционной биопсии под контролем ультразвукового исследования значительно расширились возможности дооперационной диагностики рака молочной железы (РМЖ). При выполнении данного вида биопсии образец тканей получают с помощью режущей иглы (обычно 14 G) и биопсийного пистолета. Получение множественных (например, 3-5) образцов увеличивает вероятность не только установить гистологический вариант и степень дифференцировки рака, но и выполнить иммуногистохимические и молекулярно-биологические исследования, что является сегодня чрезвычайно важным для выбора неoadъювантной терапии.

Благодаря трепанобиопсии и другим методам исследования сегодня хирург должен идти на операцию уже зная гистологический диагноз, степень злокачественности и статус сигнального лимфатического узла.

### **2.4. Исследование операционного материала**

При макро- и микроскопическом исследовании операционного материала должно быть документировано:

- Тип материала.
- Количество обнаруженных опухолевых узлов.
- Расположение опухолевого узла в квадрантах или по циферблату.
- Размер наибольшего опухолевого узла.
- Гистологическая форма инвазивного рака.
- Степень злокачественности инвазивного рака по Ноттингемской системе.
- Наличие рака *in situ*.
- Наличие инвазии кожи и скелетной мышцы.
- Расстояние до ближайшего края препарата (края резекции).

- Поражение лимфатических узлов.
- Лечебный патоморфоз.

### **2.4.1. Тип материала**

Сектор молочной железы (с регионарной клетчаткой или без) или молочная железа (с регионарной клетчаткой или без). Также при описании необходимо отметить наличие фрагмента скелетной мышцы и маркёров (проводников), если они обнаружены.

### **2.4.2. Количество обнаруженных опухолевых узлов**

В исследуемом материале может быть обнаружено более одного опухолевого узла, содержащего участки инвазивного рака. Это может наблюдаться при мультифокальном и при мультицентрическом росте. Наличие мультифокального или мультицентрического рака является неблагоприятным прогностическим фактором [Andea A.A., et al., 2002].

С практической точки зрения мультифокальным ростом опухоли следует считать очаги инвазивного рака, расположенные на расстоянии  $< 5$  см друг от друга, а мультицентрическим – расположенные на расстоянии  $> 5$  см. При мультифокальном росте все участки инвазивного роста часто имеют схожие биологические характеристики (гистологическое строение, степень злокачественности, рецепторный статус), а при мультицентрическом – различные. Однако в обеих ситуациях определение категории pT производится только для большего узла инвазивного рака независимо от его биологических характеристик.

Для множественного характера роста используется дополнительный символ “m” в категории pT (например, pT3m) или указывается количество обнаруженных узлов инвазивного рака (например, pT2(5)) [Щеголев А.И. и др. 2011].

В категории N учитывается общее количество лимфатических узлов с метастазами не зависимо от их типа гистологического строения.

### **2.4.3. Расположение опухолевого узла**

Расположение опухолевого узла по квадрантам: верхний наружный, нижний наружный, верхний внутренний, нижний внутренний, центральная зона, сосок.

#### **2.4.4. Размер наибольшего опухолевого узла**

Размер опухоли является важным прогностическим фактором. Размер опухоли должен быть определен макроскопически при вырезке и скорректирован при микроскопии, т.к. визуальное определение размера часто недостоверно. Необходимо указывать наибольший размер большего опухолевого узла. С целью сопоставления с данными неинвазивных методов исследования можно указать и два дополнительных размера. Размеры нескольких расположенных рядом опухолевых узлов не суммируются.

Если в составе опухолевого узла присутствует значительная доля рака *in situ*, то при стадировании учитывается только размер инвазивного компонента. В случае полного лечебного патоморфоза при неoadъювантной химиотерапии размер опухолевого узла не указывается, а стадия указывается как pT0 (при отсутствие резидуальной опухоли) или pTis (при наличие резидуального рака *in situ*).

Размер опухолевого узла стоит указывать с точностью до 1 мм. Следует округлять размер до наиболее близкого порогового значения, рекомендованного для категории T. Например, размер опухоли 1.1 мм должен быть представлен как 1 мм (pT1mic) или размер 2.01 см как 2.0 см (pT1c).

Если опухоль прислана на исследование фрагментированной и корректно определить размер узла не представляется возможным, то категория pT обозначается как pTX.

#### **2.4.5. Гистологическая форма инвазивного рака**

В соответствие с 4-м пересмотром классификации опухолей молочной железы (ВОЗ, 2012) выделяют следующие основные морфологические варианты инвазивного рака молочной железы — см. таблицу №1 [Lakhani S., et al., 2012].

*Таблица №1*

*Основные морфологические варианты инвазивного рака молочной железы с соответствующими кодами МКБ-О*

<b>Нозологическая форма рака</b>	<b>МКБ-О</b>
Инвазивный неспецифицированный рак	8500/3
Плеоморфный рак	8022/3
Рак с остеокластоподобными стромальными гигантскими клетками	8035/3
Инвазивный неспецифицированный рак с преобладанием лимфоидной инфильтрации	8500/3
Инвазивный неспецифицированный рак с нейроэндокринной дифференцировкой	8574/3
Инвазивный дольковый рак	8520/3
Тубулярный рак	8211/3
Крибриформный рак	8201/3
Муцинозный рак	8480/3
Медуллярный рак	8510/3
Инвазивный микропапиллярный рак	8507/3
Метапластический рак	
Метапластический неспецифицированный рак	8575/3
Железисто-плоскоклеточный рак низкой степени злокачественности	8571/3
Фиброматозоподобный метапластический рак	8572/3
Метапластический рак с плоскоклеточной метаплазией	8070/3
Метапластический рак с веретенкоклеточной метаплазией	8032/3
Метапластический рак с хрящевой дифференцировкой	8571/3
Метапластический рак с костной дифференцировкой	8571/3
Смешанный метапластический рак	8575/3
Миоэпителиальный рак	8982/3
Высокодифференцированная нейроэндокринная опухоль	8246/3
Низкодифференцированный нейроэндокринный рак/мелкоклеточный рак	8041/3
Секреторный рак	8502/3
Ацинарноклеточный рак	8550/3
Мукоэпидермоидный рак	8430/3
Онкоцитарный рак	8290/3
Светлоклеточный рак богатый гликогеном	8315/3
Рак сальных желёз	8410/3
Аденокистозный рак	8200/3
Отёчно-воспалительный рак	8530/3
Богатый липидами рак	8314/3
Богатый гликогеном рак	8315/3
Полиморфный рак низкой степени злокачественности	8525/3

В диагнозе указывается гистологическая форма наибольшего опухолевого узла. Если обнаружены опухолевые узлы меньшего размера с иным гистологическим строением, то в заключение указывается “Мультицентрическая форма рака молочной железы: 1) Форма №1. 2) форма №2”.

При исследовании операционного материала принципиальным является выявление протокового и долькового рака *in situ* с микроинвазией. Микроинвазивный рак характеризуется наличием одного или нескольких фокусов инвазивного роста, каждый из которых  $\leq 1$  мм в наибольшем измерении. Так же важно отмечать распространение рака *in situ* в кожу соска (болезнь Педжета).

#### **2.4.6. Степень злокачественности инвазивного рака по Ноттингемской системе**

Во всех инвазивных раках должна быть определена степень злокачественности согласно критериям Ноттингемской классификации (система градирования Scarff-Bloom-Richardson в модификации Elston-Ellis). Ноттингемская система определения степени злокачественности оценивает три критерия: формирование железистых структур, выраженность ядерного полиморфизма и число митозов. Каждый признак оценивается в баллах от 1 до 3. Сумма баллов определяет гистологическую степень злокачественности (см. табл. №2, 3, 4) [Elston C.W., Ellis I.O., 1991].

*Таблица №2*

*Определение степени злокачественности инвазивного рака молочной железы по Ноттингемской системе*

Признак	Баллы
<b>Формирование железистых структур</b> Формирование железистых структур оценивается при малом увеличении микроскопа. Железы должны иметь отчётливый люминальный просвет, вокруг которого расположены клетки с радиально ориентированными ядрами. Количество баллов зависит от площади, занимаемой железистыми структурами в гистологическом срезе. Железы занимают:	
- более 75% от площади опухоли	1
- 10-75% от площади опухоли	2
- менее 10% от площади опухоли	3
<b>Ядерный полиморфизм</b> Ядерный полиморфизм опухолевых клеток оценивается при большом увеличении (x40). Ядра опухолевых клеток сравнивают с ядрами люминального эпителия протоков, расположенных в окружающей ткани молочной железы. Наличие и размер ядрышка, а, так же, неровность контуров являются дополнительными критериями.	
- диаметр ядер опухолевых клеток не превышает по размеру диаметр ядер нормальных протоков или превышает менее чем в 1.5 раза, ядрышки отчётливо не визуализируются, контуры ядер ровные (Мелкие однотипные ядра).	1
- диаметр ядер опухолевых клеток в 1.5-2 раза превышает диаметр люминальных клеток нормальных протоков, неровность контуров умеренная, визуализируются мелкие ядрышки (Умеренное увеличение размера).	2
- диаметр ядер опухолевых клеток в 2 раза и более превышает диаметр ядер эпителия протоков, ядра значительно варьируют по форме и размеру, ядрышки крупные (Выраженный полиморфизм).	3
<b>Митотическая активность</b> Митотическая активность опухоли определяется как количество фигур митоза, обнаруженных в 10 последовательных полях зрения в наиболее пролиферативно активной части опухоли. Для подсчета пригодны только чётко определяемые фигуры митоза. Гиперхромные, кариоректичные или апоптотические ядра должны быть исключены из подсчета. Подсчёт производится при большом увеличении (x40). Пороговые значения приведены в табл. №3.	

Таблица №3

Подсчёт баллов для митотической активности опухоли в зависимости от диаметра поля зрения микроскопа

Диаметр поля зрения (мм)*	Количество митозов в 10 полях зрения		
	1 балл	2 балла	3 балла
0,40	≤ 4	5-9	≥ 10
0,41	≤ 4	5-9	≥ 10
0,42	≤ 5	6-10	≥ 11
0,43	≤ 5	6-10	≥ 11
0,44	≤ 5	6-11	≥ 12
0,45	≤ 5	6-11	≥ 12
0,46	≤ 6	7-12	≥ 13
0,47	≤ 6	7-12	≥ 13
0,48	≤ 6	7-13	≥ 14
0,49	≤ 6	7-13	≥ 14
0,50	≤ 7	8-14	≥ 15
0,51	≤ 7	8-14	≥ 15
0,52	≤ 7	8-15	≥ 16
0,53	≤ 8	9-16	≥ 17
0,54	≤ 8	9-16	≥ 17
0,55	≤ 8	9-17	≥ 18
0,56	≤ 8	9-17	≥ 18
<b>0,57</b>	<b>≤ 9</b>	<b>10-18</b>	<b>≥ 19</b>
0,58	≤ 9	10-19	≥ 20
0,59	≤ 9	10-19	≥ 20
0,60	≤ 10	11-20	≥ 21
0,61	≤ 10	11-21	≥ 22
0,62	≤ 11	12-22	≥ 23
0,63	≤ 11	12-22	≥ 23
0,64	≤ 11	12-23	≥ 24
0,65	≤ 12	13-24	≥ 25
0,66	≤ 12	13-24	≥ 25
0,67	≤ 12	13-25	≥ 26
0,68	≤ 13	14-26	≥ 27
0,69	≤ 13	14-27	≥ 28

\*Диаметр поля зрения вычисляется как отношение поля зрения окуляра к увеличению объектива. Поле зрения окуляра нанесено на корпус окуляра рядом с его увеличением. Например, поле зрения окуляра 23, а увеличение объектива х40. Диаметр поля зрения микроскопа составляет  $23/40 = 0.575$  мм.



Таблица №4

Определение степени злокачественности инвазивного рака молочной железы по сумме баллов

СТЕПЕНЬ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ	Сумма баллов (формирование железистых структур + ядерный полиморфизм + митотическая активность)
1	3-5
2	6 или 7
3	8 или 9

Если опухолевых узлов несколько, то в микроописании указывается степень злокачественности для всех различающихся по этому параметру опухолевых узлов. В заключение (патологоанатомическом диагнозе) указывается только степень злокачественности большего опухолевого узла.

#### 2.4.7. Наличие рака *in situ*

Указывается наличие или отсутствие протокового рака *in situ* и долькового рака *in situ*. Если протоковый рак *in situ* не сопровождается инвазивным компонентом, то указывается его размер.

Степень злокачественности протокового рака *in situ* основана преимущественно на ядерных характеристиках [Schwartz G.F., et al., 1997].

- Протоковый рак *in situ* низкой степени. Ядра однотипные по размеру и форме, с ровными контурами, неразличимыми ядрышками и единичными фигурами митоза. Размер ядра в 1.5 раза больше размера эритроцита. Определяется отчётливая базальная поляризация ядер.

- Протоковый рак *in situ* промежуточной степени. Ядра опухолевых клеток слабо/умеренно варьируют по размеру и форме, ядрышки отчётливо определяются. Размер ядра в 2 раза больше размера эритроцита.

- Протоковый рак *in situ* высокой степени. Ядра полиморфные, с неровными контурами, грубодисперсным хроматином, крупными ядрышками, нарушением поляризации, обилием фигур митоза. Размер ядра в 2.5 раза больше размера эритроцита. Часто отмечается наличие комедонекроза.

Следует помнить, что протоковый рак *in situ* ухудшает прогноз течения рака молочной железы при секторальной резекции. Поэтому, при исследовании сектора молочной железы, следует тщательно описывать характеристики рака *in situ*, особенно в случае его пре-

обладания. Если площадь протокового рака *in situ* составляет более 25% площади препарата, то края сектора молочной железы необходимо исследовать тотально, поскольку позитивные края препарата ассоциированы с высоким риском местного рецидива.

При радикальной резекции и радикальной мастэктомии характеристики рака *in situ*, сопровождающего инвазивный рак, указывать не обязательно.

Следует отмечать распространение протокового рака *in situ* в эпидермис соска (болезнь Педжета).

#### **2.4.8. Наличие лимфоваскулярной инвазии**

Указывается наличие или отсутствие лимфоваскулярной инвазии. Порог позитивности для лимфоидной инфильтрации в настоящее время ещё не определён. Можно использовать термин “рак молочной железы с преобладанием лимфоидной инфильтрации стромы”, который предполагает, что в области фронта инвазии лимфоцитов количественно больше, чем опухолевых клеток.

#### **2.4.9. Наличие инвазии кожи и скелетной мышцы**

В микроописании следует отражать распространение первичной опухоли **на кожу**.

- Опухоль вырастает в дерму и эпидермис без изъязвления кожи (не влияет на pT). При этом может наблюдаться ретракция кожи и соска.

- Опухоль вырастает в эпидермис с изъязвлением кожи (pT4b), если нет прорастания опухоли в грудную клетку (pT4c) или отёчно-воспалительной формы рака (pT4d).

- При мультифокальном росте один из фокусов инвазивного рака вырастает в кожу (pT4b). Данный очаг инвазивного рака должен быть виден макроскопически и подтверждён микроскопически.

- Опухолевые эмболы в лимфатических сосудах дермы. Если данные микроскопические изменения сопровождается клиническими признаками отёчно-воспалительного рака молочной железы (диффузное покраснение и отёк распространяющиеся как минимум на треть площади кожи молочной железы), то категория T классифицируется как pT4d. Если клинические признаки отсутствуют, то данные морфологические изменения говорят о плохом прогнозе, но не изменяют категорию pT.

**Врастание в скелетную мышцу** следует отмечать в микроописании. Врастание в большую и малую грудные мышцы не изменяет

стадию. Врастание в межрёберные мышцы классифицируется как рТ4а. Важно помнить, что скелетная мышца может являться краем резекции. Если в мышце, являющейся фасциальным краем резекции, обнаружены структуры протокового рака *in situ* — это не имеет клинического значения, т.к. рак *in situ* способен распространяться только по протокам, которых нет в более глубоких тканях. Если в мышце в фасциальном крае резекции обнаружены очаги инвазивного рака, то это может являться показанием к послеоперационной лучевой терапии.

#### **2.4.10. Расстояние до ближайшего края препарата (края резекции)**

Исследование краёв препарата является обязательным при любом типе операции. При радикальной резекции или радикальной мастэктомии следует исследовать ближний к опухоли край препарата (чаще всего это фасциальный край препарата).

Корректная идентификация специфических краёв препарата может оказаться полезной для хирурга в случае повторного вмешательства по поводу остаточной опухоли при нерадикальной первичной операции. При секторальной резекции молочной железы патологоанатом, в большинстве случаев, не может корректно маркировать края резекции. Поэтому, если возможно, фрагменты ткани молочной железы должны быть ориентированы клиницистом таким образом, чтобы было возможно определить специфические края (верхний, нижний, медиальный, латеральный и глубокий). Края препарата должны быть исследованы на предмет поражения инвазивным раком или раком *in situ* как макро-, так и микроскопически.

Хирург должен маркировать края резекции с помощью шовного материала или клипс, расположенных на поверхности фрагмента молочной железы, а так же иным способом по договоренности с патологоанатомом. Любая маркировка должна быть отражена в макроописании присланного материала. При вырезке операционного материала патологоанатом может маркировать края препарата разными способами, включая многоцветную окраску специальными красителями или помещением материала с разными краями препарата в отдельные кассеты. Если клиницист не маркировал специфические края, то все края препарата могут быть маркированы красителем одного цвета. Краситель следует наносить с осторожностью для предотвращения проникновения красящего вещества вглубь фрагмента молочной железы. Также хирург может сам прислать края ре-

зекции в виде отдельных кусочков.

Позитивный край препарата — это окрашивание красителем опухоли или наличие опухоли в фрагменте ткани, маркированном хирургом или патологоанатомом как край резекции. Поражение края препарата инвазивным раком или протоковым раком *in situ* должно быть отражено в патологоанатомическом заключении. Если при этом хирург определил край резекции (верхний, нижний, медиальный, латеральный или глубокий), то это так же следует отмечать как в микроописании, так и в заключении (диагнозе).

Если удалось получить перпендикулярные срезы по отношению к поверхности края препарата, то в заключении (диагнозе) необходимо указывать расстояние от опухоли до ближайшего края препарата, а в микроописании — до всех исследованных специфицированных краёв. Важно помнить, что распространение протокового рака *in situ* происходит по протоковой системе. Поэтому, при близком расположении опухоли к негативному краю препарата, существует вероятность наличия протокового рака *in situ* в не удалённой ткани молочной железы.

#### **2.4.11. Поражение лимфатических узлов**

Указывается количество исследованных и поражённых лимфатических узлов. Размер метастаза, а не размер лимфатического узла используется для определения категории N.

Поражение лимфатических узлов следует подразделять на следующие типы:

- Макрметастазы — размер очага поражения  $>2$  мм.
- Микрметастазы — размер очага поражения 0,2-2,0 мм или  $>200$  клеток, при дискретном расположении опухолевых клеток в ткани лимфатического узла. Если в лимфатических узлах обнаружены только микрметастазы, то в категории N они обозначаются pN1mi. Если обнаружен хотя бы один лимфатический узел с макрметастазом, то лимфатические узлы с микрметастазами включаются в общее число поражённых лимфатических узлов. При наличии нескольких “крупных” микрметастазов в лимфатическом узле (например, 7 фокусов по 1 мм в наибольшем измерении) патологоанатом имеет право увеличить категорию типа метастаза по своему усмотрению, указав на это в комментариях к патоморфологическому заключению.
- Изолированные опухолевые клетки (размер очага поражения  $<0,2$  мм или  $<200$  клеток). Часто изолированные опухолевые клетки

располагаются мелкими кластерами в краевом синусе лимфатического узла, не содержат фигур митоза и не вызывают стромальную реакцию. Количество лимфатических узлов с изолированными опухолевыми клетками указывается только в микроописании и не изменяет категорию pN. Однако для ряда опухолей, преимущественно для долькового рака, характерен тип метастазирования в виде множества дискретно расположенных опухолевых клеток в строме лимфатического узла. В таком случае, в качестве порогового значения следует использовать “200 клеток”, и если количество опухолевых клеток в продольном срезе лимфатического узла  $>200$ , то такую ситуацию не целесообразно расценивать как “изолированные опухолевые клетки”. Лимфатические узлы с изолированными опухолевыми клетками не учитываются в качестве “позитивных” при определении категории N.

В микроописании количество лимфатических узлов с поражением каждого типа указывается отдельно. В том случае, если не обнаружены лимфатические узлы с макрометастазами или микрометастазами, при стадировании учитывается наличие или отсутствие изолированных опухолевых клеток как pN0(i+) или pN0(i-), соответственно. Отдельно указывается количество лимфатических узлов с распространением поражения за пределы капсулы лимфатического узла в окружающую клетчатку. Для этого необходим один срез, включающий область предполагаемого экстранодального распространения. Опухолевые узлы в подмышечной клетчатке, без гистологических доказательств остаточной ткани лимфатического узла, классифицируются как метастазы в региональных лимфатических узлах. Опухолевые эмболы в лимфатических сосудах жировой клетчатки вокруг лимфатических узлов не расцениваются как прорастание за пределы капсулы и не влияют на категорию pN. Прямое прорастание первичной опухоли в лимфатический узел классифицируется как поражение лимфатического узла.

Материал должен быть взят в достаточном количестве, чтобы обнаружить все макрометастазы, так как их наличие имеет важное прогностическое значение. Для того, чтобы избежать ложноотрицательных результатов при исследовании лимфатических узлов, необходимо каждый лимфатический узел без макроскопически видимых изменений разрезать вдоль длинной оси на пластинки толщиной 3-4 мм и каждую пластинку исследовать микроскопически, делая из неё не менее 2-х срезов с шагом 1 мм.

Материал лимфоузлов должен быть забран таким образом, что-

бы каждый лимфатический узел мог быть исследован и учтен отдельно.

### **2.4.12. Лечебный патоморфоз**

Понятие лечебного патоморфоза введено в конце прошлого столетия и его появление связано с внедрением неoadъювантной химиотерапии злокачественных новообразований. Этот вид терапии применяется у пациенток, которым или противопоказано хирургическое лечение (при T4N2-N3-стадии) или с крупными опухолями (T2-T3) с целью уменьшения размеров опухоли, размеров и количества пораженных лимфатических узлов, элиминации микрометастазов, или с целью увеличения возможности выполнения органосохраняющего лечения, или возможности оценки чувствительности опухоли к назначаемой химиотерапии.

Лечебный патоморфоз в широком понимании — это изменение клинических и морфологических проявлений опухоли под воздействием лечения [Краевский Н.А. и др., 1993]. Эффективность неoadъювантного лечения у пациенток с раком молочной железы складывается из субъективного, объективного клинического и морфологического ответов. Субъективный клинический ответ, оцениваемый физикально (пальпаторно), часто имеет тенденцию к переоценке эффективности неoadъювантной химиотерапии. Объективный клинический ответ определяется степенью уменьшения опухоли, числа и размеров патологически измененных лимфатических узлов, выявляемые при инструментальных методах исследования (УЗИ, маммография, МРТ). Морфологический ответ — оценка совокупности морфологических изменений, происходящих в опухоли после проведенной химиотерапии.

Сегодня следует признать, что при сравнении точности физикального метода исследования, УЗИ, маммографии и МРТ, макро- и микроскопического исследования наиболее точным методом является микроскопическая оценка размеров опухоли. Все прочие методики склонны переоценивать результаты неoadъювантного лечения (т.е. преуменьшать размеры остаточной опухоли) либо недооценивать ее (т.е. преувеличивать размеры опухоли) [Краевский Н.А. и др., 1993]. Лучевые и другие методы оценки лечебного патоморфоза ограничены в своей способности обеспечить точную информацию о Т и N категориях, и достаточно часто при ответе, расцененном как полный патоморфоз лучевыми методами, в операционном материале при морфологическом исследовании выявляются элементы опу-

холи [Schott A.F., et al., 2005, Галахин К.А и др., 2000]. Таким образом, достоверность прогноза по лечебному патоморфозу опухоли существенно повышается при его морфологической оценке. Следовательно, оценка лечебного патоморфоза должна обязательно включать морфологическое исследование операционного материала.

Накопление результатов морфологических проявлений лечебного патоморфоза (морфологического ответа) привело к формированию понимания ряда закономерностей, основных в той или иной мере стереотипно повторяющихся изменений в строении тканей и клеток опухоли, которые исследователи постарались не только описать, но и, каким-то образом, упорядочить и классифицировать. Морфологический ответ опухоли на лечение меняется не только в зависимости от используемых химиопрепаратов, но и от протокола их введения в организм пациентки (суммарная доза препарата, продолжительность введения, способа введения), а, так же, времени между окончанием химиотерапии и резекции опухоли. Все эти моменты необходимо учитывать при последующем сравнении получаемых эффектов в разных протоколах исследования.

Морфологический патоморфоз включает в себя альтерацию, гибель клеток, репаративные процессы, воспаление и склероз. В лечебном патоморфозе при гистологическом исследовании можно выделить 2 основных этапа изменений — ранние и поздние [Галахин К.А и др., 2000].

1 этап (ранние изменения) — максимально проявляются через 7 дней после начала химиотерапии. Выявляются одностипные дистрофические и альтеративные изменения опухоли на фоне выраженных сосудистых расстройств (стазы, полнокровие сосудов, сладж-феномен, микротромбозы, плазмо- и геморрагии) и воспалительная инфильтрация. В опухолевых клетках как правило наблюдается выраженный плеоморфизм, увеличение размеров их ядра, появление многоядерных клеток, конденсация хроматина, появление вакуолей в ядре, выраженная эозинофилия цитоплазмы клеток, появление в цитоплазме вакуолей.

2 этап (поздние изменения) — в полной мере проявляются через 2 недели и более от начала неoadьювантной терапии. Разрастается соединительная ткань вокруг очагов некроза, появляются признаки склероза, гиалиноза и миксоматоза опухоли. Вокруг скоплений опухолевых клеток образуются лимфоплазмочитарные инфильтраты, появляются гигантские многоядерные клетки инородных тел и ксантомные клетки, формируются периваскулярные лимфоцитар-



ные инфильтраты.

Однако все выше перечисленные признаки обоих этапов с трудом поддаются стандартизации при их оценке и в значительной степени субъективны.

Основным, наиболее часто оцениваемым большинством исследователей гистологическим признаком терапевтического патоморфоза следует признать объемную долю сохранивших после лечения жизнеспособность опухолевых клеток. Другие параметры, такие как распространенность некроза, сосудистые изменения, воспалительную инфильтрацию, как правило, рассматривают как дополнительные факторы и редко оценивают качественно или полуколичественно. Однако всегда было понимание того, что для оценки лечебного патоморфоза важен многофакторный анализ, учет нескольких показателей, а не только объем резидуальных опухолевых элементов. Однако такое исследование становится достаточно трудоемким, а это значит, что внедрение многофакторных способов оценки патоморфоза по-видимому будет возможно лишь на основе внедрения в работу патоморфологических лабораторий методов автоматизированного анализа большинства показателей.

Несмотря на все выше сказанное до сих пор гистологическая оценка лечебного патоморфоза имеет меньшее распространение, чем лучевые методы. Это связано, прежде всего, с трудоемкостью такого исследования и достаточно низкой объективности получаемых данных. Нужно учитывать, что при сложившейся системе проведения морфологического исследования исследуется лишь часть опухоли, однако полученные результаты исследования в последующем автоматически переносятся на весь ее объем, при этом игнорируется явление гетерогенности опухоли. Субъективной является и оценка соотношения в опухоли жизнеспособной и некротической ткани, поскольку четкие границы между ними часто отсутствуют. В опухоли могут наблюдаться спонтанные некрозы, не связанные с проведенной химиотерапией, часто в ней прослеживается градиентный характер изменений - их выраженность постепенно убывает от центра к периферии опухоли.

Одной из первых гистологических классификаций выраженности лечебного патоморфоза предложена Е.Ф. Лушниковым [Лушников Е.Ф., 1976], согласно которой выделяют 4 степени лечебного патоморфоза, характеризующиеся следующими признаками:

- I (слабый) — дистрофические изменения отдельных опухолевых клеток;



- II (умеренный) — появление очагов некроза и дистрофические изменения опухолевых клеток;

- III (выраженный) — обширные поля некроза, резко выраженные дистрофические изменения опухолевых клеток, сохраняют жизнеспособность немногочисленные опухолевые клетки;

- IV (резко выраженный, полный) — отсутствие опухолевых элементов, тотальный некроз опухоли.

Наиболее распространенная методика оценки лечебного патоморфоза в России стала схема Г.А. Лавниковой [Лавникова Г.А., 1979]. Она основана на учете изменения общей структуры опухоли на тканевом (соотношение строма/паренхима, структурная атипия) и клеточном уровне (степень дистрофии и полиморфизма клеток, митотическая активность). Данная классификация выделяет 4 степени лечебного патоморфоза:

- I степень — более 50% опухолевой ткани сохранено;

- II степень — сохранено 20–50% опухолевой ткани;

- III степень — до 20% ткани опухоли сохранилось в виде отдельных очагов;

- IV степень — полное отсутствие опухолевой ткани.

Для объективизации оценки лечебного патоморфоза по Г.А. Лавниковой используется количественный показатель — индекс повреждения (ИП), рассчитываемый по формуле:

$$ИП = \frac{Пк - Пл}{Пк} \times 100, (1)$$

где:

Пк — средний объем жизнеспособной опухолевой ткани (без лечения); Пл — средний объем жизнеспособной опухолевой ткани (после лечения); ИП — индекс повреждения в процентах (от 100 до 0).

Для определения индуцированных лечением некрозов в опухолевой ткани используется формула:

$$A = \frac{B}{C} \times 100, (2)$$

где:

В — количество клеток в некрозе; С — общее количество опухолевых клеток; А — процент клеток в состоянии некроза по отношению ко всем опухолевым клеткам.

Ряд пациентов подвергается гормональной терапии или химиотерапии на предоперационном этапе (неоадьювантная терапия). Ответ инвазивного рака на такую терапию является важным прогностическим фактором с точки зрения безрецидивной и общей выживаемости [Франк Г.А., и др., 2015]. Для морфологической оценки лечебного патоморфоза было предложено несколько классификаций [Франк Г.А., и др., 2015, Miller I.D., et al., 2002]. С практической точки зрения лечебный патоморфоз в первичной опухоли и в метастазах в лимфатических узлах следует подразделять на полный и неполный, либо его отсутствие.

Стадия после неоадьювантной терапии также имеет важное прогностическое значение. Категории T и N в этом случае маркируются добавлением префикса “y” (ypT и ypN).

Инвазивный рак с минимальным ответом на терапию может не измениться в размерах. С увеличением степени ответа на терапию в опухоли снижается количество клеток инвазивного компонента и увеличивается объём фиброзированной стромы. Категория T оценивается по наибольшему фокусу инвазивного рака. Префикс “m” используется в случае обнаружения множественных фокусов инвазивного рака. При оценке размеров опухоли нельзя учитывать бесклеточные зоны фиброзированного ложа опухоли. Если после проведённого лечения участки инвазивного рака не обнаружены, но остались структуры протокового рака *in situ* и/или метастазы в регионарных лимфатических узлах, то это отражается в патологоанатомическом заключении без указания стадии.

После терапии большинство опухолей имеют ту же степень злокачественности по Ноттингемской системе, что и до начала лечения. В некоторых случаях степень злокачественности может быть выше за счет более выраженного ядерного полиморфизма. В редких случаях степень злокачественности может стать ниже из-за снижения митотической активности опухоли.

Если перед началом терапии инвазивный компонент опухоли был негативен по экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и/или Her2, рекомендуется повторить исследование рецепторного статуса опухоли после терапии, так как в ряде случаев может быть обнаружено изменение рецепторного статуса из-за внутриопухолевой гетерогенности и ограниченности материала, получаемого для первичной диагностики.

## Статус лимфатических узлов (ЛУ)

Полный лечебный патоморфоз первичного метастатического поражения ЛУ в некоторых случаях невозможно установить с уверенностью, потому что метастазы могут исчезать и без образования рубца либо оставлять небольшой фиброзный рубец. Грубый фиброзный рубец в ЛУ без признаков наличия опухоли однозначно указывает на наличие полного лечебного патоморфоза.

Частичный патоморфоз в ЛУ характеризуется наличием изолированных клеток или кластеров опухолевых клеток, окруженных тонким гиалиновым стромальным фиброзом. ИГХ окрашивание с цитокератинами помогает идентифицировать опухолевые клетки, которые трудно обнаружить при обычной окраске.

В англоязычной литературе используемый в России термин «лечебный патоморфоз» в практике не применяется. Вместо него обычно определяют степень регресса опухоли или ответ опухоли на лечение. Регресс опухоли — это менее объёмный критерий, чем лечебный патоморфоз, т.к. оценивается всего лишь только непосредственные изменения опухоли на проведенную химиотерапию. Оценка регресса опухоли требует более формализованного подхода к проводимым исследованиям, использования признаков, подлежащих объективной оценке и, по сути, уже почти на прямую не связано с описанием морфологии опухоли [Франк Г.А., и др., 2015]. Более того, в настоящее время сделан следующий шаг в понимании места оценки лечебного патоморфоза — классификация по Miller I.D., Payne S. (1999, 2001) уже разработана с учетом показателей общей выживаемости в зависимости от изменения клеточности опухоли [Miller I.D., et al., 2002]. В классификации выделено пять степеней ответа опухоли на лекарственное лечение. Только при полном отсутствии опухолевых клеток в первичной опухоли и в регионарных лимфатических узлах устанавливается полный патоморфологический ответ (**pathologic Complete Response — pCR**). При этом в исследуемом материале может присутствовать карцинома *in situ*.

В 1981 г. ВОЗ была принята клиническая классификация степеней ответа опухоли на лечение, основанная на изменении линейных размеров новообразования, определяемых лучевыми методами исследования [Miller I.D., et al., 2002]. В 2000 г. классификация пересмотрена и представлена как критерии оценки ответа солидных опухолей (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors — RECIST) [Therasse P., et al., 2000]. В соответствии с этой классификацией различают варианты ответа опухоли:

- **полный ответ (Complete Response — CR)** — полное исчезновение всех опухолевых поражений в течение 4 недель с момента документации полного ответа;

- **частичный ответ (Partial Response — PR)** — уменьшение, по сравнению с исходным на 50% и более, суммы измерений 2 больших перпендикулярных диаметров. При этом должны отсутствовать признаки прогрессирования заболевания;

- **прогрессирование заболевания (Progressive Disease — PD)** — увеличение размеров опухоли, появление любого нового очага или нового выпота, или асцита, связанного с опухолью;

- **стабилизация заболевания (Stable Disease — SD)** — несоответствие критериям CR или PR при отсутствии PD.

Новая версия 1.1 RECIST опубликованная в 2008 г. отличается как значениями количественных показателей, так и увеличением числа оцениваемых параметров, ранжировки их значимости. Она включает оценку основных (target lesions) и дополнительных (non-target lesions) очагов опухолевого поражения (роста) [Eisenhauer E.A., et al., 2009].

**Оценка основных очагов** (количественная) осуществляется по критериям:

- **CR:** исчезновение всех основных очагов. Любой из увеличенных лимфатических узлов (основных или дополнительных) должен иметь короткую ось менее 10 мм;

- **PR:** уменьшение суммы диаметров основных очагов не менее чем на 30%;

- **PD:** увеличение на 20% и более суммы диаметров основных очагов, которая в абсолютном выражении составляет не менее 5 мм; появление одного или нескольких новых очагов;

- **SD:** несоответствие критериям CR или PR при отсутствии PD.

**Оценка дополнительных очагов** (качественная):

- **CR:** исчезновение всех дополнительных очагов и нормализация уровня опухолевых маркеров. Все лимфатические узлы должны иметь размер менее 10 мм по короткой оси;

- **Non-CR/Non-PD:** сохранение одного или нескольких основных очагов и/или сохранение уровня опухолевого маркера выше нормы;

- **PD:** однозначная прогрессия дополнительных очагов, появление одного или нескольких новых очагов.

В классификации опухолей молочной железы ВОЗ 2012 г. приве-

дено уже 8 различных систем оценки pCR [Lakhani S.R., et al., 2012]. Из них наибольший интерес представляет Кельнская система классификации регрессии опухоли (The Cologne Regression Classification System), основанная на принципах классификации ВОЗ и выделяющая 4 класса, в модификации Y. Shimosato с соавт. [Shimosato Y., et al., 1971], где дополнительно учитывается объем жизнеспособных и некротически измененных элементов опухоли, а так же статус региональных лимфатических узлов:

**I класс** — минимальная/отсутствие регрессии с сохранением более чем 50% жизнеспособных элементов опухоли с наличием метастазов в лимфатических узлах (ypN1);

**II класс** — частичная регрессия с сохранением менее чем 50% и более чем 0% жизнеспособных опухолевых элементов — малая регрессия (классы I/II) без метастазов в лимфатические узлы (ypN0);

**III класс** — отсутствие жизнеспособных опухолевых элементов — выраженная регрессия (классы III/IV), но с наличием метастазов в лимфатических узлах (ypN1);

**IV класс** — полная регрессия без каких-либо признаков опухолевого процесса — выраженная регрессия (классы III/IV) без метастазов в лимфатические узлы (ypN0).

Одновременно продолжилось дальнейшее изучение, расширение количества изучаемых морфологических показателей опухоли, имеющих прогностическое значение для оценки патоморфоза, таких как: изменение объемов жизнеспособной, дистрофической и дискомплексированной ткани, характеристика митотической активности и апоптоза в остаточной опухоли, характер и выраженность воспалительной реакции, количества гигантских клеток, характеристика, тип и степень воспалительной реакции в строме опухоли [Vincent-Salomon A., et al., 2004, Aas T., et al., 2003, Miller I.D., et al., 2002]. Такой многофакторный подход в оценке лечебного патоморфоза может быть и повышает объективность и прогностическую значимость метода, но существенно усложняет проведение самого морфологического исследования. В то же время, накопление большого объема данных о лечебном патоморфозе позволило в мультицентровых исследованиях провести анализ и отобрать наиболее значимые показатели, имеющие существенное значение для его оценки и на их основе формировать представления о прогнозе течения заболевания конкретного пациента для планирования и коррекции последующих этапов лечения [Penault-Llorca F., et al., 2008].

С другой стороны, активно продолжились и клинические мульти-

центровые исследования, задачей которых являлось установление основных параметров опухоли, влияющих на эффективность проводимой терапии. Было показано, что такие характеристики опухоли, как меньший размер, высокая пролиферативная активность, РЭ(-) и РП(-) рецепторный статус опухоли, гистологическая форма инвазивного протокового рака, прогнозируют высокую чувствительность к химиотерапии и вероятность достижения полного морфологического эффекта, что немаловажно при планировании адекватного неoadъювантного подхода. Так при небольших **размерах опухоли** с наличием регионарных метастазов чаще достигается pCR. Уменьшение размеров опухоли стали рассматривать в качестве признака ее радио- или химиочувствительности, а также как важный прогностический фактор, коррелирующий с выживаемостью онкологических больных [Chollet P., et al., 2002]. Размер опухоли и клинический статус лимфатических узлов оказались значимыми «предсказывающими» факторами степени регресса опухоли в ответ на предоперационную химиотерапию. Установлено, **что степень злокачественности опухоли** является не только важным прогностическим фактором, коррелирующим с течением болезни, но и фактором, предсказывающим вероятность получения полного морфологического ответа в опухоли. Частота полных морфологических эффектов прямо пропорциональна степени анаплазии: если при 1-й и 2-й степени злокачественности частота полных морфологических ответов составляет всего 10%, то при высокоагрессивных опухолях (3-я степень) вероятность получения полного морфологического ответа (pCR) при использовании химиотерапии повышается до 90% [Miller I.D., et al., 2007]. Показано, что отрицательный **стероидный рецепторный статус** опухоли является фактором, предсказывающим хороший ответ на химиотерапию и высокую частоту получения полного морфологического ответа. Показано, что у пациенток с местно-распространенным раком молочной железы частота pCR составила 24% при отрицательном гормональном статусе и 8% при гормональночувствительных опухолях [Burcombe R.J., et al., 2005]. **Гиперэкспрессия HER2** является неблагоприятным прогностическим фактором, коррелирующим с большим размером опухоли, высокой пролиферативной активностью, анеуплоидией, высокой степенью гистологической злокачественности, метастатическим поражением лимфатических узлов, агрессивным течением болезни и низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости больных РМЖ. Однако использование в качестве таргетной

терапии моноклонального антитела к HER2 рецептору позволило улучшить как непосредственные результаты лечения (объективный ответ и частоту pCR), так и отдаленные результаты терапии HER2-позитивного рака молочной железы. Показано, что частота полного морфологического ответа при HER-позитивном раке выше, чем при HER-негативном (23,5% против 7,1%), а при использовании таргетной терапии и химиотерапии у больных с гиперэкспрессией HER-2 отмечено значительное увеличение частоты достижения pCR (до 37%) [Puglisi F., et al., 2015, Hamy-Petit A.S., et al., 2016, Chang H. et al., 2010., Hicks M., et al., 2015]. Установлено, что опухоли **базального подтипа** активно пролиферируют и имеют самую высокую частоту полных морфологических регрессий pCR — до 45%, опухоли же **люминального подтипа** с более низким уровнем пролиферации показывают соответственно более низкую частоту pCR (около 6%) [Rouzier R., et al., 2004, Minckwitz G., et al., 2012, Бриллиант А.А., и др., 2013]. Получены данные о корреляции **гистологического варианта** опухоли молочной железы и степени лечебного патоморфоза у больных раком молочной железы. Наибольшая чувствительность к химиотерапии и вероятность достижения полного морфологического регресса (до 15%) отмечена при инвазивном протоковом раке. Дольковый рак часто ассоциирован с люминальным подтипом опухолей и низкой частотой достижения pCR (0–3%); при редких гистологических типах опухолей (папиллярном и слизистом раке) полных морфологических регрессий не отмечено (0%) [Cristofanili M., et al., 2005, Cocquyt V.F., et al., 2003].

Установлено, что при раке молочной железы морфологический ответ на предоперационную химиотерапию прямо коррелирует с безрецидивной и общей выживаемостью, а полная морфологическая регрессия опухоли pCR является важнейшим фактором прогноза [Daidone M.G., et al., 1999, Wolmark N., et al., 2001]. Показано, что максимальная общая выживаемость наблюдаются при полном патоморфозе, минимальная — при слабом или его отсутствии (Рис. 5). Полная регрессия опухоли (IV степень) сопровождается максимальными показателями общей выживаемости: 3-, 5-, 10-летняя выживаемость у пациенток этой группы равна 100%, 92,3%, 83,1 соответственно. Напротив, при невыраженном патоморфозе общая выживаемость на аналогичных сроках составила 57,8%, 42,3%, 28,7% соответственно. Показатели безрецидивной выживаемости имеют аналогичную тенденцию: при полном патоморфозе 3-, 5-, 10-летняя безрецидивная выживаемость составила 85,6%, 76,1%, 76,1%, тогда



как при слабом — 42,9%, 33,7%, 28,7% соответственно [Огнерубов Н.А., 1992, Fisher E.R., et al., 2002].

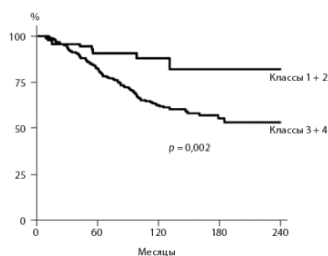


Рис. 5. Общая выживаемость пациенток с РМЖ после проведенной неоадьювантной химиотерапии. Класс 1 — полный патоморфологический ответ (pCR), класс 2 — хороший ответ, 3 — слабый ответ, 4 класс — резистентность к проведенной терапии.

Показано, что лучшая общая и безрецидивная выживаемость достигается у пациенток с местно-распространенным раком молочной железы в ходе неоадьювантного лечения у которых удалось добиться полного морфологического регресса в лимфатических узлах, даже при наличии остаточных проявлений опухоли в молочной железе (исследование Anderson Cancer Center, Texas, USA) [Symmans W.F., et al., 2007].

Анализ основных параметров при ответе опухоли на неоадьювантную химиотерапию и их роли в достижении pCR привел к разработке искусственного критерия — **Residual Cancer Burden** (дословно: «ложе остаточной опухоли», **RCB**), позволяющего предсказывать прогноз заболевания, определять вероятность безрецидивной выживаемости пациенток [Symmans W.F., et al., 2007, Peintinger F., et al., 2015]. Критерий рассчитывается на основании измерения остаточной опухоли (двухмерные показатели с учетом возможной асимметрии опухоли), ее клеточности (по классификации Miller-Payne), наличия в опухоли рака *in situ*, а также числа пораженных ЛУ и размеров наибольшего метастаза.

В развитии этого процесса в 2014 г. FDA одобрило применение оценки **Pathological Complete Response** (полного патологического ответа опухоли, **pCR**) в качестве суррогатного маркера эффективности неоадьювантной терапии, как имеющего существенное прогностическое значение для пациенток с РМЖ, а в 2015 г. выпущены методические рекомендации международного экспертного сооб-



щества по РМЖ — BIG-NABCG, содержащие основные принципы стандартизации оценки полного патологического ответа опухоли pCR на проведенную неоадьювантную химиотерапию [Bossuyt V., et al., 2015, Kaufmann M., et al., 2006]. Сообщество приняло консенсусное решение — для того чтобы оценить степень ответа опухоли на проведенную химиотерапию необходимо и достаточно из большого числа предлагаемых сегодня критериев эффективности лечения одномоментно учитывать только лишь следующие параметры:

1. Размеры остаточной опухоли;
2. Клеточность опухоли;
3. Наличие в материале карциномы *in situ*;
4. Количество метастазов и размеры наибольшего метастаза.

Этот подход позволил не только выделить пациенток РМЖ с pCR и с неполным ответом опухоли на химиотерапию, но и разделить их на группы в зависимости от степени выраженности патоморфологических изменений. Это же позволило отнести конкретную пациентку в группу с разным прогнозом выживаемости и, соответственно, проводить коррекцию проводимой последующей химиотерапии.

В Anderson Cancer Center (Texas, USA) на основе этих представлений разработана относительно стандартизированная система оценки остаточной опухолевой нагрузки по характеристике **Residual Cancer Burden** с учетом ранжирования выраженности основных признаков лечебного патоморфоза и введения их в разработанную математическую модель, учитывающую показатели кривых безрецидивной выживаемости пациенток с РМЖ [Symmans W.F., et al., 2007, Peintinger F., et al., 2015]. Учитываются следующие параметры опухоли:

1. **Размер остаточной опухоли.** Учитывается размер наибольшего узла опухоли, выражается в мм. Измерения проводятся в двух проекциях, выбираются два наибольшие размера с учетом асимметрии опухоли. Необходимо так же оценить расстояние от опухоли до краев ее хирургической резекции. Для выполнения этой задачи следует маркировать края резекции краской или прошивать их лигатурами. Удаленный макропрепарат исследуется путем рассечения на пластины ткани толщиной до 5 мм. Это наиболее сложная для оценки позиция, т.к. размеры, границы «ложа опухоли» часто достаточно трудно точно оценить как макроскопически, так и при гистологическом исследовании [Apple S.K., et al., 2006]. В любом случае для исключения ошибки полученные результаты морфологического исследования необходимо сопоставить с предоставленными

ми клиническими данными о локализации и размерах опухолевого узла.

**2. Клеточность опухоли.** Оценивается средняя клеточность остаточной опухоли в нескольких произвольно выбранных микроскопических областях ее ложа. Клеточность микроскопической области рассчитывается как соотношение количества опухолевых клеток и стромы опухоли и выражается в %. Фокусы некроза, кровоизлияния, фиброза при расчете клеточности опухоли не учитываются. Необходимо рассчитать общую клеточность от средних значений оценок в нескольких различных микроскопических областях ложа опухоли. Для примера: если клеточность в различных областях ложа опухоли оценили как: 20%, 10%, 20%, 0%, 20%, 30% — то средняя оценка общей клеточности составит 20%.

Могут использоваться готовые шаблоны оценки клеточности для облегчения и ускорения расчетов (Miller-Payne, RCB system) [Carey L.A., et al., 2005].

Выбирается и используется для введения в калькулятор один из следующих вариантов: 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%.

Признается полезной оценка клеточности с помощью сканирования гистологического среза «ложа опухоли», с последующим автоматизированным расчетом средней клеточности исследованных микроскопических полей.

**3. Наличие и площадь, занимаемая Carcinoma in situ (CIS).** Микроскопически выявляется CIS и выбирается один из следующих вариантов, занимаемой карциномой in situ площади в «ложе опухоли»: 0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

**4. Количество лимфоузлов (ЛУ) с метастазами.** Статус ЛУ является наиболее важным прогностическим фактором у пациентов, получавших неоадьювантную химиотерапию. Следует учитывать, что ответ опухоли на проведенное лечение в метастазах имеет даже большую прогностическую значимость, чем в основном узле [Apple S.K., et al., 2006, Symmans W.F., et al., 2007,]. Отсутствие опухолевых клеток или наличие в ткани лимфоузла участков фиброза с наличием активированных гистиоцитов расценивается как признак полного лечебного патоморфоза. Наличие метастазов, выявление микрометастазов (размеры менее 2 мм) и даже наличие в синусах лишь единичных опухолевых клеток (возможна уточняющая ИГХ реакция с PanKeratin) — все это расценивается как признаки неполного

лечебного патоморфоза и заносится для расчетов RCB в калькулятор. Оценка лечебного эффекта в ЛУ может оказаться более затруднительна чем в первичной опухоли, и даже невозможна у некоторых пациентов, если пораженный ЛУ был удален до начала проведения неoadьювантной химиотерапии во время биопсии сигнальных ЛУ.

**5. Размер самого большого метастаза.** Определяется и заносится в калькулятор наибольший диаметр самого большого метастаза, размер оценивается в мм.

Для стандартизированного расчета RCB можно и нужно использовать размещенный в свободном доступе на сайте Anderson Cancer Center on line калькулятор: [www.mdanderson.org/breastcancer\\_RCB](http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB), с помощью которого, при соответствующей предварительной подготовке, достаточно легко получить ранжированный численный индекс, отражающий индивидуальный ответ опухоли на проведенную неoadьювантную терапию РМЖ (Рис. 6). Использование предложенных процедур оценки материала и последующего обсчета данных на калькуляторе позволяет максимально стандартизовать процедуру и обеспечить сопоставимость получаемых данных у разных пациенток.

THE UNIVERSITY OF TEXAS  
**MD Anderson**  
**Cancer Center**  
Making Cancer History®

Request an appointment | You can help. Give now

International Center | English | myMDAnderson | Newsroom | Facebook | Twitter | YouTube | LinkedIn

About Us | Locations | Events | How You Can Help | Careers | Clinical Trials | Contact Us

Education and Research

Research | Education and Training | Resources for Professionals | Events

Home » Resources for Professionals » Clinical Tools and Resources » Clinical Calculators

E-mail | Print | Text Size

**Residual Cancer Burden Calculator**

\*Values must be entered into all fields for the calculation results to be accurate.

**(1) Primary Tumor Bed**

Primary Tumor Bed Area:  (mm) X  (mm)

Overall Cancer Cellularity (as percentage of area):  (%)

Percentage of Cancer That is *in situ* Disease:  (%)

**(2) Lymph Nodes**

Number of Positive Lymph Nodes:

Diameter of Largest Metastasis:  (mm)

Reset Calculate

Residual Cancer Burden:

Residual Cancer Burden Class:

The following parameters are required from pathologic examination in order to calculate Residual Cancer Burden (RCB) after neoadjuvant treatment:

Рис. 6. On-line калькулятор MDAnderson Cancer Center \*: \*Для расчета RCB подготовленные заранее значения должны быть введены обязательно во все поля калькулятора

По получаемому на калькуляторе индексу (**Residual Cancer Burden**), определяются четыре степени (класса) ответа опухоли (**Residual Cancer Burden Class**) на проведенную терапию, по которым ориентируются на прогноз заболевания и с его учетом решают вопрос о назначении дальнейшей химиотерапии:

**При значении индекса RCB 0** — расценивается как полный патологический ответ (pCR) — CR (complete response) — отсутствие опухоли в молочной железе и исследованных лимфатических узлах — определяет клинически хороший прогноз;

**При значениях индекса RCB <1,36 — RCB I** — частичный ответ PR (partial response) — расценивается как минимальная остаточная болезнь, низкий риск прогрессирования заболевания;

**При значениях индекса RCB от 1,36 до 3,28 — RCB II** — минимальный ответ NR (minimal/no response), расценивается как умеренная остаточная болезнь, промежуточный риск прогрессирования заболевания;

**При значениях индекса RCB >3,28 — RCB III** — расценивается как выраженная остаточная болезнь, резистентность к проведенной терапии — PD (progressive disease) — высокий риск прогрессирования заболевания.

В мультицентровых исследованиях показано, что предлагаемая система оценки «ложа остаточной опухоли» RCB в настоящее время является наиболее объективной и воспроизводимой. Конкордантность проводимых исследований с ее применением составляет от 0,90 до 0,95, что позволяет ее рекомендовать для внедрения в работу патоморфологических лабораторий. При этом патологоанатом должен быть уверен, что материал был исследован в достаточном объеме, выбранные для исследования фрагменты опухоли соответствуют локализации ее ложа, что необходимые для оценки данные предоставлены ему клиницистами в полном объеме. Так, утвержденная Российским обществом патологоанатомов в 2015 г. форма учетной карточки пациента РМЖ после проведения неоадьювантной химиотерапии для определения RCB в настоящее время включает в себя 45 учетных показателей [Андреева Ю.Ю., и др., 2016].

### 2.4.13. Стадирование по pTNM

В патологоанатомическом заключении важно указать стадию по TNM (pTNM). Стадия pTNM основана на информации, полученной в результате макро- и микроскопического исследования операционного материала. Патологическое стадирование опухо-

лей представляет дополнительные точные и объективные данные. Классификация по категориям T, N, и M произведённая врачом-патологоанатомом, обозначается префиксом “p” (pT, pN, pM). Возможная комбинация префиксов, например, ypT.

### **Префиксы для категорий TNM:**

- m (множественные опухолевые узлы инвазивного рака)
- r (рецидив)
- y (после неоадьювантной терапии)
- sn (сторожевой лимфатический узел)

### **Первичная опухоль (pT):**

- pTX: первичная опухоль не может быть оценена
- pT0\*: первичная опухоль не определяется
- pTis\*: протоковый или дольковый рак *in situ*, а также болезнь Педжета соска, не сопровождающаяся инвазивным раком
- pT1: опухоль  $\leq 20$  мм в наибольшем измерении
  - pT1mi: микроинвазивный рак
  - pT1a: опухоль более 1 мм, но не более 5 мм в наибольшем измерении
  - pT1b: опухоль более 5 мм, но не более 10 мм в наибольшем измерении
  - pT1c: опухоль более 10 мм, но не более 20 мм в наибольшем измерении
- pT2: опухоль более 20 мм, но не более 50 мм в наибольшем измерении
- pT3: опухоль более 50 мм в наибольшем измерении
- pT4: опухоль любого размера, прорастающая грудную стенку и/или кожу
  - pT4a: опухоль прорастает в грудную стенку за исключением инвазии грудной мышцы
  - pT4b: изъязвление кожи и/или сателлитный узел в коже и/или отёк кожи
  - pT4c: комбинация признаков pT4a и pT4b
  - pT4d: отёчно-воспалительная форма рака молочной железы

*Примечание: \* — эти категории используются и в тех случаях, если при исследовании биоптата был диагностирован инвазивный рак, который подвергся полному лечебному патоморфозу в результате неоадьювантной терапии.*

### **Региональные лимфатические узлы (pN):**

- pNX: региональные лимфатические узлы не возможно оценить (были удалены ранее или не предоставлены для патоморфологического исследования)

- pN0: при гистологическим исследованием метастазы в региональных лимфатических узлах не обнаружены

- pN0 (i-): в лимфатических узлах не обнаружены метастазы ни при гистологическом исследовании, ни иммуногистохимическим методом

- pN0 (i+): при гистологическом или иммуногистохимическом исследовании в лимфатических узлах обнаружены изолированные опухолевые клетки

- pN0 (mol-): в лимфатических узлах метастазы не обнаружении ни морфологически, ни при проведении молекулярно-биологического исследования (РТ-ПЦР)

- pN0 (mol+): в ткани лимфатического узла обнаружена маркёрная РНК опухолевых клеток, однако метастазы не выявлены при рутинном гистологическом исследовании или иммуногистохимическом исследовании

- pN1mi: микрометастазы

- pN1a\*\*: метастазы в 1-3 подмышечных лимфатических узлах, один из которых макрометастаз

- pN2a\*\*: метастазы в 4-9 подмышечных лимфатических узлах, один из которых макрометастаз

- pN3a\*\*: метастазы в  $\geq 10$  подмышечных лимфатических узлах, один из которых макрометастаз

*Примечание: \*\* — критерии pN1b, pN1c, pN2b, pN3b, pN3c – см. в “TNM: Классификация злокачественных опухолей” [Щеголев А.И. и др., 2011].*

### **Отдалённые метастазы (pM):**

Морфологическая диагностика наличия метастазов (pM1) требует биопсии метастатического узла и подтверждения наличия опухоли. Таким образом, категория pM0 является неопределяемым понятием и может не использоваться. Она может быть установлена только на аутопсии.

### Глава 3. Иммуногистохимические (иммуноморфологические) исследования

Современная диагностика РМЖ требует не только верификации гистологического варианта и степени дифференцировки новообразования, но и обязательной оценки прогноза течения болезни, а также предсказания ответа на терапию. В настоящее время для выбора оптимальной лечебной тактики, выбора адекватного лекарственного лечения (антиэстрогены, антроциклиновые антибиотики, герцептин и т.д.) следует установить не только стадию развития рака (с характеристикой по системе TNM), гистологический вариант и степень злокачественности, но и обязательно — иммунофенотип, что достигается выполнением иммуногистохимического исследования.

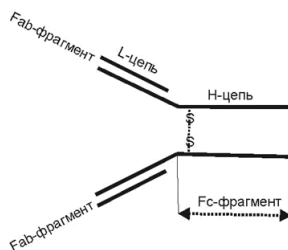
Иммуногистохимия (ИГХ) — это метод качественной и полуколичественной гистологии, с помощью которого выявляется наличие и локализация того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с заранее известными исследователю мечеными антителами.

Родоначальниками иммунологического метода считается группа исследователей под руководством проф. А. Кунса, которые впервые в 1941 г. получили меченные флюоресцеином антитела и применили их в диагностических целях. В последующее время проводилось постоянное усовершенствование метода. Так в 1970 г. исследовательская группа prof. Sternberger разработала пероксидаза-антипероксидазный метод. В 1975 г. prof. G. Köhler и prof. C. Milstein разработали гибридную технологию, которая основана на слиянии (гибридизации) миеломных клеток со спленоцитами иммунизированных животных, что дало возможность получать моноклональные антитела в больших объемах. За цикл выполненных работ авторы гибридной технологии получили нобелевскую премию в 1984 г. В начале 1990 гг. были разработаны методы соединения антител с биотином, авидина — с ферментами, что значительно упростило методику, привело к повышению стабильности (воспроизводимости) получаемых результатов и привело к внедрению данной методики сначала в научно-исследовательских центрах, а затем и в лаборатории практического здравоохранения. В настоящее время синтезировано большое количество коммерческих антител как поли-, так и моноклональных, которые выпускаются уже промышленным путем.

### 3.1. Основные понятия

**Антигеном** называют любое вещество, которое при попадании в организм вызывает иммунный ответ, в результате которого вырабатываются специфические белки или антитела. Антигенами обычно являются высокомолекулярные белки и полисахариды. Та часть молекулы антигена, которая соединяется с антителом, называется эпитопом или антигенной детерминантой. Биологические объекты, которые состоят из множества макромолекул, например бактерии, содержат большое количество эпитопов, в этом случае говорится о коэкспрессии (сочетании) антигенов, что в свою очередь, определяет и разнообразие антител, характеризующий данный объект исследования.

**Антитела** представляют собой  $\gamma$ -глобулины и называются иммуноглобулинами. Наиболее распространен класс иммуноглобулинов G (IgG). Молекула IgG состоит из двух субъединиц, соединенных дисульфидными связями. Каждая субъединица состоит из двух полипептидных цепей — тяжелой (H-цепи) и легкой (L-цепи), которые также как и субъединицы иммуноглобулина, соединены между собой дисульфидными мостиками (Рис. 7).



*Рис. 7 Принципиальная схема структуры молекулы IgG.*

В каждой молекуле IgG выделяют следующие области: Fc-фрагмент (constant fragment) и Fab-фрагмент (antibody fragment). Структура Fc-фрагмента идентична для всех молекул IgG у определенного вида животных. Таким образом, Fc-фрагмент определяет видоспецифичность антител и не участвует во взаимодействии антитела с антигеном. Структура Fab-фрагмента крайне вариабельна. Именно Fab-фрагмент определяет специфичность антитела, поскольку участвует во взаимодействии с эпитопом антигена. Каждая молекула IgG имеет в своем составе два Fab-фрагмента, то есть является бивалентной и может соединяться с двумя различными антигенными детерминантами.



Иммуноглобулины являются макромолекулами и сами могут выступать в роли антигенов. При введении иммуноглобулинов в организм животного другого вида получают антитела к Fc-фрагменту. Поскольку Fc-фрагмент определяет видоспецифичность, то полученные антитела являются специфичными к иммуноглобулинам данного вида животного. Таким способом получают т.н. «вторичные антитела», используемые в современных визуализационных системах при постановке иммуногистохимических реакций.

Антитела можно конъюгировать (связывать) с флуорохромами или ферментами, используя аминокислотные остатки; чаще всего используется ковалентное взаимодействие между  $\epsilon$ -аминогруппой и лизином. Полученные в этом случае антитела называются конъюгированными или мечеными.

Антитела, используемые в иммунологических методиках, получают путем иммунизации различных лабораторных животных (мышей, кроликов, крыс и др.). После выработки антител у животного забирается кровь, из которой затем выделяют фракцию антител (иммуноглобулинов).

При проведении иммуногистохимических реакций используются моно- и поликлональные антитела.

**Моноклональные антитела** продуцируются клонами клеток гибридомы, считается что они абсолютно идентичны по молекулярной организации, специфичности и родству к антигену. Такая однородность моноклональных антител делает более стабильной результаты по их дальнейшему разведению, что обеспечивает высокую воспроизводимость результатов, а высокая специфичность обеспечивает определение антигена при экспрессии с другими антигенами. При этом моноклональные антитела связываются только с одним участком молекулы антигена, и это определяет меньшую чувствительность ИГХ метода, проявляющуюся более слабым конечным окрашиванием на срезах. При использовании моноклональных антител предъявляются более жесткие требования к фиксатору и времени фиксации материала, т.к. денатурация белка приводит к ранней быстрой утрате небольшого числа эпитопов в ткани.

**Поликлональные антитела**, получаемые при иммунизации животных, обычно кроликов, коз или овец, содержат антитела одновременно к разным эпитопам антигена. В результате этого при проведении ИГХ реакций образуются крупные интенсивно окрашивающиеся комплексы с антигеном благодаря одновременному связыванию антител с многими эпитопами антигена, т.е. они менее чув-

ствительны к конформационным изменениям антигена. Однако, в то же время, соответственно они являются менее специфичными, при сравнении с моноклональными антителами.

Полученный комплекс «антиген-антитело» можно определить в ткани среза — визуализировать. Для этого используются различные метки, обычно связанные с Fc-фрагментом антител. В качестве таких меток используются: разнообразные ферменты, флюорохромы, металлопротеиды, радиоизотопы, биотин и др. Метки присоединяются или к первичным антителам — в этом случае говорят о прямом методе выявления или к вторичным антителам — непрямой метод.

Прямой метод предполагает использование меченых меткой первичных антител против интересующего антигена (Рис. 8). Это наиболее простой метод визуализации, однако чувствительность его крайне низкая, так как на одну молекулу искомого антигена будет приходиться всего одно меченое антитело.



Рис. 8. Схематическое изображение прямого иммуногистохимического метода

Непрямой метод предполагает использование двух различных антител. Первичное антитело реагирует с антигеном клетки. Связанное с меткой вторичное антитело избирательно специфически связывается с первичным, которые для вторичных антител являются по сути антигеном (Рис. 9). Непрямой метод значительно более чувствительнее прямого, т. к. с каждой молекулой первичных антител связывается несколько молекул вторичных антител, содержащих метку, что проявляется более яркой реакцией в срезе при проведении ИГХ реакции.



Рис. 9. Схематическое изображение непрямого иммуногистохимического метода

Некоторые особенности использующихся меток. На первом этапе развития метода иммунофенотипирования, а за тем и ИГХ в качестве меток наиболее часто использовали флюорохромы. И в настоящее время эти метки имеют достаточно широкое распространение как в научных, так и гистологических лабораториях патоморфологических отделений.

**Метод прямой иммунофлуоресценции** — антиген связывается с антителом, конъюгированным с флуоресцентной меткой в настоящее время используется достаточно редко, т.к. метод имеет низкую чувствительность восприятия для человеческого глаза и требует дополнительно флуоресцентного микроскопа с соответствующей оптикой и набором фильтров. В то же время для проведения проточной цитометрии при выполнении иммунофенотипирования метод остается основным, т.к. чувствительность используемых детекторов свечения значительно выше человеческого глаза, а методика окраски материала достаточно проста.

**Метод непрямой иммунофлуоресценции** — в этом случае антиген связывается с первичным специфическим антителом, а флуоресцентная метка связана со вторичным антителом, специфичным к Fc-фрагменту первичного антитела. В этом случае чувствительность восприятия метода значительно выше, результат реакции можно оценивать в флуоресцентный микроскоп, т.к. интенсивность свечения значительно выше, по сравнению с прямым методом. Однако опять же метод требует наличия в лаборатории хорошего флуоресцентного микроскопа с наборами объективов и фильтров, кроме того методика приготовления препарата более сложная, а препараты не подлежат архивированию, т.к. происходит быстрое выцветание меток.

Указанные недостатки побудили исследователей к разработке использования при проведении ИГХ реакций других видов меток. Наиболее широкое распространение в настоящее время достигли так называемые **иммуноферментные методы** с использованием ферментных меток. В этом случае молекула фермента, связанная с вторичным антителом, вступает в реакцию с большим количеством молекул субстрата а образующийся нерастворимый комплекс, выпадающий в осадок с красителем, располагается в срезе непосредственно около антигена, что позволяет видеть окрашивание в обычный световой микроскоп, которое связано с определенными структурами в гистологическом срезе.

Наиболее часто в современных визуализационных системах в ка-

честве ферментной метки используется пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза (AP). Метод выявления активности пероксидазы основан на окрашивании красителя, который выступает в роли донора электронов, в присутствии перекиси водорода. В качестве красителя (хромогена) наиболее часто используются: 3-диаминобензидин тетрагидрохлорид (DAB) — в этом случае продукты реакции окрашиваются в коричневый цвет или 3-амино-9-этилкарбазол (АЕК) — красного цвета.

Необходимо помнить, что пероксидаза и щелочная фосфатаза присутствует в небольших количествах и в нормальных тканях организма. Особенно велика концентрация пероксидазы в клетках крови, поэтому для окраски мазков крови, костного мозга и срезов органов кроветворения и иммунной защиты методы с использованием этого фермента, как правило, не применяются. При окраске других тканей пероксидазная активность нейтрализуется добавлением перекиси водорода перед инкубацией с первичными антителами.

Иммуноферментные методы также подразделяются на прямые (антиген связывается с антителом, конъюгированным с ферментной меткой) и непрямые (антиген связывается с неконъюгированным специфическим антителом (первичным антителом); ферментная метка конъюгирована со вторичным антителом, специфичным к Fc-фрагменту первичного антитела).

Следующим шагом в развитии систем визуализации стали системы с использованием антител против пероксидазы и щелочной фосфатазы (РАР и АРААР-комплексы). На первом этапе на гистологический срез наносятся первичные антитела, на втором этапе наносятся вторичные антитела против первичных (связующее антитело), при этом один из антигенсвязывающих участков вторичных антител связывается с первичным антителом, а второй остается свободным; на третьем этапе вносятся антитела против пероксидазы или щелочной фосфатазы, полученные от животного того же вида, от которого получены первичные антитела, антигенсвязывающие участки которого заняты соответствующим ферментом. Эти антитела связываются со вторым антигенсвязывающим участком вторичных (связующих) антител. В результате проведения реакции формируется комплекс, где с одним антигеном оказываются связанными уже не одна, а две молекулы фермента, что соответственно увеличивает чувствительность метода почти в 2 раза (рис.10).



*Рис. 10. Принципиальная схема иммуногистохимической реакции при использовании РАР-метода.*

Настоящим прорывом стала разработка в 1979 году метода непрямого иммуноокрашивания с использованием биотин-авидинового комплекса. Биотин (витамин Н) — соединение, стойкое к действию высоких температур, к кислой и щелочной среде, хорошо растворяется в воде и спирте. Он является коферментом во многих реакциях присоединения (карбоксилирования). Биотин легко может вступать в стойкое соединение с различными белками, в том числе с ферментами и иммуноглобулинами. В большом количестве биотин содержится в белках птичьих яиц, где он связан с гликопротеидом авидином.

Авидин образует с биотином чрезвычайно стойкий комплекс. Разрушить такой комплекс можно только при температурной обработке, т. к. авидин разрушается при нагревании. Авидин имеет 4 места связывания, к которым можно присоединить биотин или белки. Таким образом, комплекс биотин-авидин можно использовать как связующий мостик между антителами и ферментами. Для этого готовится комплекс, состоящий из фермента, связанного с биотином, и авидина. В образующемся комплексе три центра связывания авидина связаны через биотин с ферментом или флюорохромом, а четвертый остается свободным. Комплекс формируется в три этапа: на первом этапе немеченные первичные тела соединяются с антигеном, на втором этапе меченные биотином вторичные антитела соединяются с первичными, на третьем добавляется комплекс авидин-биотин-фермент, который присоединяется к биотину вторичных антител (Рис. 11).

После инкубации с вторичными антителами, связанными с биотином, добавляют комплекс авидин-биотин-фермент. Таким образом, с одной молекулой антигена оказываются связанными три молеку-

лы фермента. Данный метод был назван ABC-методом (Avidin and Biotinylated Complex).

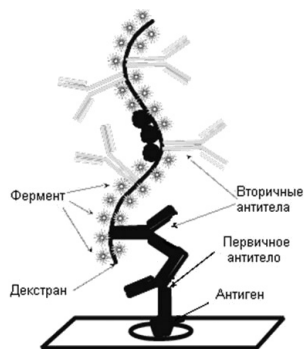


Рис. 11. Принципиальная схема проведения иммуногистохимической реакции с использованием ABC-метода.

К сожалению, и данный метод не лишен недостатков, так как авидин соединяется с эндогенным биотином, который в большом количестве содержится в печени и почках, а также он может соединяться с лектинами и заряженными группами в тканях.

Дальнейшее развитие получила эта технология после замены авидина на *стрептавидин* — белок, который получают из микроорганизмов *Streptomyces avidinii* (SaBC-метод). Стрептавидин обладает такими же способностями связывать биотин, как и авидин, но в отличие от него он не имеет заряда в нейтральной среде, не связывается с эндогенными ферментами и намного меньше с эндогенным биотином. Замена авидина на стрептавидин позволила резко уменьшить фоновое окрашивание и повысить чувствительность метода приблизительно в 8 раз.

Дальнейшим развитием систем визуализации стала разработка полимерных систем. Основой систем является декстрановая молекула, на которой осаждают до 20 молекул первичных или вторичных антител и до 100 молекул фермента. Таким образом, одна молекула антигена оказывается связанной со 100 молекулами фермента, что обеспечивает крайне высокую чувствительность (Рис. 12).



*Рис.12. Принципиальная схема проведения иммуногистохимического исследования с применением полимеров.*

Иммуногистохимические исследования в настоящее время стали чрезвычайно широко распространены и являются **рутинным методом** исследования в патоморфологической или научной гистологической лаборатории. Более того, реактивы уже производятся достаточно большим количеством компаний, однако основные принципы, лежащие в основе их производства и разобранные выше остаются неизменными и претерпевают только постоянную некую модернизацию. Проведение ИГХ исследования превратилось в некую технологию, по сути, которая является стандартной и лаборатория, в которой произошла постановка для исследования одного антигена, легко может проводить исследования и других, меняя в технологии только первую позицию — антитело, сохраняя все остальные, т.к. система визуализации является универсальной. Значительное количество шагов проведения исследования в настоящее время успешно компенсировано разработкой автоматизированных роботизированных станций для проведения иммуногистохимических исследований — иммуностейнеров. Внедрение автоматизации рабочего процесса не только облегчает труд лаборантов-гистологов и медицинских техников, но и создает предпосылки для стандартизации проведения ИГХ исследований в лаборатории, приближает лабораторию к выполнению стандартов качества лабораторных исследований. Однако отсутствие автостейнера в лаборатории не в коей мере не является основанием не внедрять и не проводить ИГХ исследования в лаборатории. Все эти исследования успешно могут проводиться и с использованием ручного труда лаборантов. Основное при этом условие — соблюдение требований протоколов им-

муногистохимических исследований и инструкций, прикладываемых к коммерческим наборам, используемым в лаборатории [Петров, Райхлин, 2012, 2016].

### **3.2. Требования к патоморфологической лаборатории, занимающейся ИГХ**

При **принятии решения** о необходимости постановки ИГХ метода исследования в лаборатории необходимо учитывать **требования, сформулированные ASCO/CAP** к патоморфологической лаборатории:

- 1) обязательное использование стандартизованных методов ИГХ исследования;
- 2) возможность обеспечить для ИГХ исследований внешний контроль качества;
- 3) количество иммуногистохимических исследований в год в лаборатории не должно быть меньше 250.

Необходимо так же учитывать дополнительные расходы, которые потребуются заложить в бюджет лаборатории для выполнения иммуногистохимических исследования. Средняя себестоимость одного исследования, выполняемого на иммуностейнере колеблется от 450 до 700 руб. Если лаборатория оснащена автостейнером, то снизить эти расходы на исследования не представляется возможным. Снижение затрат на проводимые ручным методом ИГХ исследования всегда связаны с грубыми нарушениями технологий окраски, а значит увеличением доли вероятности появления ошибок.

Остановимся на основных методических моментах, которые следует учитывать при проведении ИГХ исследований в лаборатории первого просмотра материала. Как было указано выше, «золотым стандартом» исследования рака молочной железы являются исследования, включающие в себя панель следующих антител: Estrogen, Progesterone, Her2 neu, Ki-67, относящиеся как к прогностическим так и предсказывающим факторам. Поэтому именно этот набор исследований мы рекомендуем и далее остановимся на некоторых методических особенностях его выполнения в лаборатории.

**Первое с чего нужно начать** при постановке ИГХ метода в лаборатории — определить сотрудников, которые будут заниматься выполнением исследований. Наиболее благоприятным является наличие возможностей выделения врача и лаборанта (медицинского техника, биолога), которые будут заниматься только данной методикой. Отвлечение работников на другие исследования и работы всег-



да приводит к увеличению вероятности нарушений технологического процесса, что сопровождается снижением качества выполняемых исследований. Определенных на методику людей необходимо обучить, для чего наиболее правильно направить их на стажировку на рабочее место в региональную референс-лабораторию (лабораторию второго просмотра) или центральную референс-лабораторию. В дальнейшем, учитывая ключевую роль патоморфологической диагностики, на первый план выходит важность обучения, регулярность и своевременность переподготовки, повышения квалификации врачей и лаборантов по патологической анатомии [Франк и др., 2012]. Возможности улучшения качества патоморфологических исследований при раке молочной железы включает в себя не только обучение, но и обязательность дальнейшего включения лаборатории первого просмотра в схему референс-системы (пересмотра материала).

Прежде чем начать исследования ответственным за постановку ИГХ исследования нужно определиться с необходимым набором оборудования и реагентов. Практика показывает, что чаще всего копируется организация работы и комплектация лаборатории, в которой проходило обучение специалистов. И это имеет большой позитивный смысл, т.к. в этом случае берутся на вооружение уже готовые схемы и решения, предотвращаются ошибки процесса организации, присущие новой лаборатории, а значит, в конечном итоге экономятся значительные средства и сокращается время от начала организационных мероприятий до запуска лаборатории. С другой стороны становится понятно, как важно чтобы лаборатория, в которой проходило обучение работников, была действительно передовой и могла вложить в головы современную идеологию инновационного развития патологической анатомии что будет сказываться в их работе всю последующую профессиональную жизнь.

**Необходимый комплект оборудования** для проведения иммуногистохимических исследований. Первоначально иммуногистохимия формировалась на основе проведения реакций на замороженных срезах с использованием флуоресцентных меток. Это требовало дополнительного дорогостоящего оборудования (микротомы-криостаты), флуоресцентных микроскопов, накладывало временные ограничения во времени проведения реакций и не позволяло формировать архив иммуногистохимических препаратов. В первую очередь здесь играла роль невозможность проведения реакций на фиксированных в формалине тканях. Однако, по-

степенно развитие технологии привело к тому, что почти все основные реакции сегодня доступны для иммуногистохимии на срезах из фиксированного в формалине материала. Поэтому, если в лаборатории нет каких-то специальных особых задач, лучше сориентироваться на постановку исследований на парафиновых срезах из материала после формалиновой фиксации. Исходя из выше сказанного можно обозначить необходимый комплект оборудования для проведения ИГХ исследований. В него входит:

1. Комплект общего гистологического оборудования. Прежде чем приступать к постановке ИГХ исследований следует постараться укомплектовать гистологическую лабораторию современным оборудованием, что в значительной мере решит проблемы с качеством материала а лаборатории первого просмотра. Необходимо традиционное гистологическое оборудование, позволяющее получать качественные гистологические микропрепараты: аппарат для гистологической проводки материала, аппарат для заливки парафиновых блоков, хороший микротом с одноразовыми сменными ножами, световой микроскоп (желательно с хорошей оптикой, исследовательского класса с цифровой цветной фотокамерой), холодильник для хранения ИГХ реактивов и буферов (можно бытовой); термостат – 2 шт. (один устанавливается на температуру 37°C, другой – на 60°C.), автомат для закрытия гистологических стекол, систем архивирования блоков и стекол.

2. Дополнительное оборудование для выполнения ИГХ метода. Набор дополнительного оборудования, зависит от того какой вариант проведения ИГХ исследований планируется: ручной или автоматизированный.

Ручной метод требует наличия:

- Батарею емкостей для депарафинизации и регидратации (емкости для окрашивания) не менее 12 шт.;

- Стеклопосуда (колбы для буферов, стаканы, цилиндры, емкости, бутылки);

- Контейнеры с держателем термически и химически стойкий для термической обработки материала для проведения демаскировки антигена — не менее 3 шт.;

- Оборудование для термической обработки: или термобаня баня для ИГХ (до 100° С, прецизионная) или микроволновая печь (можно использовать бытовую, мощностью не менее 800 Вт.);

- Пипеточные дозаторы с набором наконечников: малого объема 0,5 – 10 мкл., среднего 1-50, 20-200, большого до 1000 мкл., до 5000

мкл. — по 1 шт. каждой позиции);

- Гидрофобный карандаш для ИГХ — 2 шт.;

- Весы (для самостоятельного приготовления навесок солей для буферов) — 1 шт.; Совет: лучше приобретать уже готовые растворы.

- рН-метр (для контроля рН приготовленных буферов) – 1 шт.; Совет: лучше приобретать уже готовые буфера.

Автоматизированный метод потребует:

- водяная баня или специализированный модуль предобработки для автостейнера или автостейнер с интегрированным этапом предподготовки гистологических срезов (типа BenchMark, Ventana или Bond Max, Leica);

- иммуностейнер. При выборе типа автостейнера нужно исходить из финансовых возможностей лаборатории, учитывать потребуется открытая система или допустима закрытая (возможность использования реагентов других производителей), нужно сравнить стоимость предлагаемых к использованию производителем реагентов и расходных материалов, сроки их доставки после заключения договора, наличие сервисной поддержки и собственной инженерной службы, наличие гарантийного срока обслуживания и постгарантийных обязательств, стоимость сервисного обслуживания после окончания гарантии, наличие возможности выполнения на иммуностейнере других исследований (например ISH) и обязательств по обучению сотрудников лаборатории на рабочем месте.

### **Необходимый набор реагентов и расходных материалов**

Сюда относятся предметные стекла с адгезионным полилизинным покрытием, растворы предподготовки срезов, промывочные буфера, набор первичных антител, подходящие для них системы визуализации, контрольные стекла.

Обязательно возникнет вопрос о том, какие клоны и каких производителей лучше приобрести. Давать советы в данном направлении дело неблагодарное. Пока сотрудники лаборатории не приобретут собственный практический опыт нужно исходить из следующих основных принципов:

- 1) качество реактивов и расходных материалов, изготовленных на профильном специализированном производстве лучше, чем те, которые можно приготовить в лаборатории;

- 2) качество готовых реагентов (с маркировкой RTU — Ready-to-Use Reagents) изначально будет лучше и более стабильным, а прово-

димые исследования, соответственно более воспроизводимыми как внутри лаборатории, так и в последующем в других лабораториях, в том числе и при прохождении референс-исследований;

3) желательно использовать для проведения конкретного исследования реагенты от одного производителя (для первичных антител — соответствующие визуализационные системы);

4) необходимо соблюдать указанные в инструкции к антителу рекомендуемые для использования визуализационные системы;

5) следует строго придерживаться инструкций, прилагаемым к каждому реагенту;

6) необходимо обращать внимание на сроки годности реагентов и расходных материалов;

7) соблюдайте требования, предъявляемые производителем к условиям хранения реагентов;

8) не следует пытаться экономить на реагентах на снижении объемов реагентов, указанных в инструкции, повторном использовании растворов и т.д.

В тоже время, можно воспользоваться экспертной оценкой реактивов, которая представлена в любой международной системе контроля качества иммуногистохимических исследований. Как пример можно привести европейскую систему контроля качества Нордик (выход на сайт через <http://www.nordiqc.org>).



На сайте размещена информация о характеристике первичных антител и визуализационных систем, используемых при постановке иммуногистохимических реакций от основных производителей, дается их сравнительная характеристика, указываются особенности основных клонов антител от разных производителей, приводятся оптимальные протоколы исследований, проводятся тестирования качества проводимых исследований лабораторий из разных стран. Таким образом, выйдя на сайт можно легко составить свое собственное мнение на основании информации, предоставленной независимыми экспертами из разных стран.

Прежде чем приступить к постановке иммуногистохимической реакции следует проверить комплектность реагентики и соответствие ее отдельных компонентов. Так, необходимо проверить на соответствие маркировки мышиных антител (M — Mouse) и мышиной

(М или универсальной) визуализационной системы. Если же используется антитело кроличье (R – Rabbit) то соответственно должна использоваться соответствующая (R или универсальная) визуализационная система. В противном случае, при несовпадении иммуногистохимическая реакция не будет осуществляться, а препарат не будет специфически окрашиваться.

### **3.3. Постановка иммуногистохимического исследования (рекомендуемый протокол)**

Для успешного проведения иммуногистохимической реакции и ее необходимо создать некие стандартные условия, которые, с одной стороны, повысили бы эффективность взаимодействия антигена с антителом, а с другой — свели бы к минимуму неспецифическое окрашивание (фон). С этой целью применяют комплекс приемов обработки срезов перед их инкубацией с антителами - протокол. Протокол состоит из этапов, выполнение которых является обязательным условием получения стабильного воспроизводимого результата.

При проведении диагностических исследований желательно пользоваться только реагентами сертифицированными для диагностики, а также строго соблюдать предписанные производителями антител и наборов протоколы и рекомендации.

**1. Подбор парафинового блока.** Проводка и заливка в парафин осуществляются по общепринятым схемам. Необходимо помнить, что для получения стабильных результатов проведения ИГХ исследований в качестве фиксаторов материала при изготовлении парафинового блока необходимо использовать нейтральный забуференный формалин, этанол или этанол-формальдегид. Фиксация в этанол-формальдегиде (1–2% раствор формалина на 80° этаноле) позволяет добиться более высокого качества окраски и упростить иммуногистохимический протокол. Желательно использовать очищенные сорта парафина с добавлением восков или специально разработанные на основе парафина среды с модифицирующими добавками. Заливка в целлоидин и целлоидин-парафин нежелательна, так как приводит к развитию неспецифической фоновой окраски. Имея гистологические стекла с обзорной окраской нужно выбрать соответствующий блок, в срезе которого имеются структуры, подлежащие ИГХ исследованию.

**2. Получение гистологических срезов с парафиновых блоков,**

как при обычной гистологии (основные правила разобраны выше) непосредственно перед проведением иммуногистохимического исследования. Толщина среза должна составлять около 4 мкм. Приготовленные на микротоме срезы монтируют на стекла, высушивают, депарафинируют и регидратируют. Для обеспечения целостности среза удобнее использовать готовые к использованию предметные стекла с полилизинным покрытием. Полученный препарат высушивают при комнатной температуре в течение 12-18 час. или для ускорения процесса его можно поместить на 1 ч. в термостат с температурой 60°C.

**3. Предобработка парафиновых срезов** для иммуногистохимии начинается с удаления парафина и воды из срезов с использованием ксилола и этанола (как для обычной гистологии). Следует все время заменять использованные реагенты на свежие, т.к. плохое удаление парафина из среза будет приводить к нарушению окрашивания или минимум к усилению неспецифического фона при ИГХ окраске.

**4. Демаскировка антигенов.** Этап связан с особенностями действия фиксатора – формалина на эпителии антигенов ткани, с целью их максимального высвобождения. Выполняется с использованием нагревания гистологического среза в цитратном буфере (Target Retrieval Solution) в результате чего происходит восстановление антигенной активности образца. Проводится или в водяной бане или в микроволновой печи или в модуле предобработки автостейнера или в самом автостейнере, оснащенный этой функцией. Удобством последнего варианта является ненужность переноса стекол из модуля в автостейнер, при этом весь процесс осуществляется в автоматическом режиме.

Необходимо обратить внимание:

4.1. на pH цитратного буфера в зависимости от используемого в дальнейшем первичного антитела. Так при использовании антител к Estrogen, Progesterone, Ki67 должны использоваться растворы с высоким pH (pH 9,0), что касается HER2 neu — применяется раствор с низким pH (pH 6,0). Учитывая важность этапа, желательно буфер приобретать в лабораторию готовый к использованию (RTU), концентрированный, требующий только разведения водой в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2. температура восстанавливающего раствора должна достичь 98-99°C. Т.о. стекла помещаются в раствор комнатной температуры, затем начинается нагрев (который длится около 25 мин.) и время обработки учитывается только после достижения заданной тем-

пературы.

4.3. после достижения заданной температуры время инкубации срезов в растворе должно составить 40 мин.

4.4. после прохождения заданного времени обработки стекловый буфер остывает (около 20 мин.), после чего стекла переносятся для проведения ИГХ исследования.

В последнее время появились растворы для проведения предподготовки среза, позволяющие одномоментно осуществить и депарафинирование, дегидратацию и предобработку. Однако нужно дополнительно аккуратно относиться к применению таких растворов: вовремя производить их замену, осуществлять постоянный мониторинг качества проводимых процедур по контрольным срезам.

### **5. Промывка стекол в буфере.**

5.1. Стекла достают из раствора предподготовки и переносят в промывочный буфер на 2 мин.

5.2. Срезы достают из буфера, слегка подсушивают, удаляя излишки буфера (не до высыхания!),

5.3.1. при ручном способе выполнения ИГХ исследований — обводят гидрофобным карандашом вокруг среза (для предотвращения растекания реагентов).

5.3.2. при автоматизированном — стекла в кассетах сразу же помещают в автостейнер.

**6. Блок эндогенной пероксидазы.** Позволяет удалить из гистологического среза эндогенную пероксидазу для снижения неспецифической фоновой окраски. Для этого гистологические срезы помещаются в блокирующий раствор (Peroxidase-Blocking Solution, 3% водный раствор перекиси водорода) при комнатной температуре на 5 мин.

**7. Промывка срезов в буфере.** После каждого проведенного этапа ИГХ исследования срезы на 5 мин. помещают в промывочный буфер. Наиболее часто для этой цели используют TBS-буфер pH 7,0-7,6. Буфер можно приготовить самостоятельно в лаборатории, однако значительно проще его приобрести уже в готовом виде.

**8. Нанесение первичных антител.** На область расположения гистологического среза наносится 100 мкл раствора антител (первичное антитело) к соответствующему антигену. Антитела предварительно должны быть разведены до рабочей концентрации в соответствии с рекомендациями производителя. Максимальные и минимальные границы разведения для каждого антитела рекомендованы в инструкции по применению соответствующего антитела. При



закупке маточных растворов антител стоимость получаемых к использованию оказывается на 30% меньше по сравнению с готовыми. Однако, в практике, часто гораздо удобнее использовать готовые антитела (с маркировкой RTU). Использование таких антител исключает возникновение ошибок, связанных с неправильным их разведением. Кроме того, требуется учитывать, что при приготовлении рабочих разведений антител должен использоваться специальный раствор – разбавитель (Antibody Diluent). Инкубация первичных антител продолжается 30 мин. при комнатной температуре.

**9. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, однако не допуская его высыхания.

**10. Инкубация с применением визуализационной системы.** В соответствии с инструкцией по использованию на гистологический срез наносится 100 мкл. визуализирующего реагента (вторичное антитело и HRP комплекс Labelled Polymer). Необходимо проверить соответствие визуализационной системы и используемого антитела. В своей работе мы используем универсальную визуализационную систему, которая позволяет одновременное использование как мышиных так и кроличьих первичных антител, что полностью исключает возможность ошибки соответствия. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации – 30 мин.

**11. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в промывочном TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, не допуская его высыхания.

**12. Инкубация с хромогеном.** Непосредственно перед постановкой реакции готовят рабочий раствор хромогена (из расчета 20 мкл (1 капля) на 1 мл субстрата) с учетом расхода 100 мкл на один гистологический срез. Чаще всего в ИГХ реакциях используется DAB Chromogen, связывающийся с комплексом используемой визуализационной системы с образованием нерастворимого осадка и обеспечивающий интенсивное коричневое окрашивание непосредственно у изучаемых структур. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации – 10 мин.

**13. Промывка среза** в дистиллированной воде, его ополаскивание.

**14. Подкраска ядер.** Для дифференцировки структур в срезе обычно докрашивают ядра клеток гематоксилином. Для этого используют основной краситель, чаще всего гематоксин (Mayer's Hematoxylin, Lillie's Modification), который дает синее окрашивание



без фиолетовых оттенков, что облегчает интерпретацию ИГХ реакции в последующем.

**15. Заключение ИГХ среза.** Срезы после проведения ИГХ реакций могут длительно сохраняться в архиве без ухудшения их качества. Для обеспечения сохранности среза необходимо соблюдать все этапы его заключения, которые не отличаются от обычных процедур: препараты дегидратируют (проводят по спиртам удаляя воду), просветляют (проводя через ксилолы) и заключают в бальзам или синтетическую среду. Последний этап можно выполнить как в ручную, так и с использованием автомата для закрытия стекол, значительно облегчающего труд лаборанта-гистолога. Гистологические срезы, закрытые покровными стеклами с применением синтетических сред можно микроскопировать уже через 30 мин.

Постановка ИГХ исследования с применением иммуноавтостейнера в значительной мере позволяет стандартизировать проведение реакций, обеспечивать воспроизводимость получаемого результата. Наличие в референс-лаборатории иммуноавтостейнера и использование современных протоколов проведения исследования в настоящее время крайне желательно, что отражено и в требованиях ASCO/CAP к патоморфологической лаборатории: Использование стандартизованных процедур обработки материала, Использование стандартизованных методов ИГХ и ИНС исследования.

### **Необходимые для ИГХ исследования контроли**

Для того чтобы правильно интерпретировать результаты иммуногистохимического исследования и убедиться в том, что все процедуры исследования были выполнены правильно, требуется одновременно с диагностическими препаратами исследовать несколько контрольных срезов. Чаще всего достаточно иметь два контрольных препарата, обрабатываемых вместе с исследуемой серией (положительный и отрицательный контроль) и один препарат из исследуемой серии, который служит для негативного контроля первичных антител.

### ***Положительный контроль антигена***

В качестве положительного контроля используются срезы, в которых заранее точно известно наличие исследуемого антигена. Если при постановке иммуногистохимической реакции в положительном контроле не выявляется специфического окрашивания, результаты всей обрабатываемой серии следует забраковать и приступить

к анализу протокола и используемых реагентов для выяснения причины ошибки.

### ***Отрицательный контроль антигена***

В качестве отрицательного контроля используют срезы, про которые заранее точно известно, что в них определяемый антиген отсутствует. Выявление какой-либо положительной реакции в отрицательном контроле вынуждает забраковать результаты всей серии. Этот результат свидетельствует о неспецифической реакции, говорящей о наличии грубых нарушений в соблюдении протокола ИГХ исследования.

### ***Отрицательный контроль антител***

Для постановки этого контроля следует использовать один из препаратов обрабатываемой серии. Вместо первичных антител в соответствующих пунктах протоколов обработки на срезы необходимо нанести разбавитель антител. В таком контроле при окраске положительная реакция должна отсутствовать. Наличие положительной реакции свидетельствует о неспецифичности окраски, причем за счет некачественных реактивов или (в значительно меньшей степени) грубых нарушений протокола ИГХ окрашивания.

## **3.4. Иммуногистохимическая диагностика РМЖ**

В настоящее время морфологическое исследование карциномы молочной железы подразумевает проведение гистологического исследования, с последующим определением молекулярно-биологических характеристик опухоли, к которым относятся: определение экспрессии уровней рецепторов к эстрогену, прогестерону и HER2 neu, а так же определение уровня активности пролиферативных процессов в ткани опухоли.

Выполнение ИГХ исследования экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов и HER-2 neu рекомендуется уже в морфологической лаборатории первого просмотра. Повторное проведение исследования экспрессии HER-2 neu, особенно с неясным уровнем экспрессии — т.н. 2+, в настоящее время рекомендуется только в лаборатории второго просмотра материала. Кроме того, важным прогностическим признаком для РМЖ служит уровень пролиферативной активности, которую можно изучать, используя антитела в ИГХ реакции к компонентам, вовлеченным в процесс репликации клеток опухоли (белки-регуляторы пролиферации – Ki-67, PCNA и актив-

ность апоптоза, которая определяется уровнем экспрессии, факторов, участвующих в запуске программированной клеточной гибели (для примера — каспаза, циклин А, регуляторный белок р53).

Т.о. «золотым стандартом» ИГХ исследования РМЖ является определение уровней экспрессии на опухолевых клетках:

- 1) рецепторов к эстрогену,
- 2) рецепторов к прогестерону,
- 3) рецепторов к HER2 neu,
- 4) уровня пролиферативных процессов по экспрессии Ki67 в ткани.

За каждым из указанных маркеров стоят особенности прогноза развития заболевания и различные варианты назначаемой пациентке терапии. Развитие иммуногистохимической диагностики даже привело к созданию новой классификации РМЖ, учитывающей особенности иммунофенотипа клеток опухоли.

Согласно этой классификации можно выделить 5 подтипов карцином молочной железы: luminal A, luminal B (HER2-), luminal B (HER-2+), HER-2-overexpression, basal-like (Рис. 13).

### Молекулярно-биологические варианты РМЖ

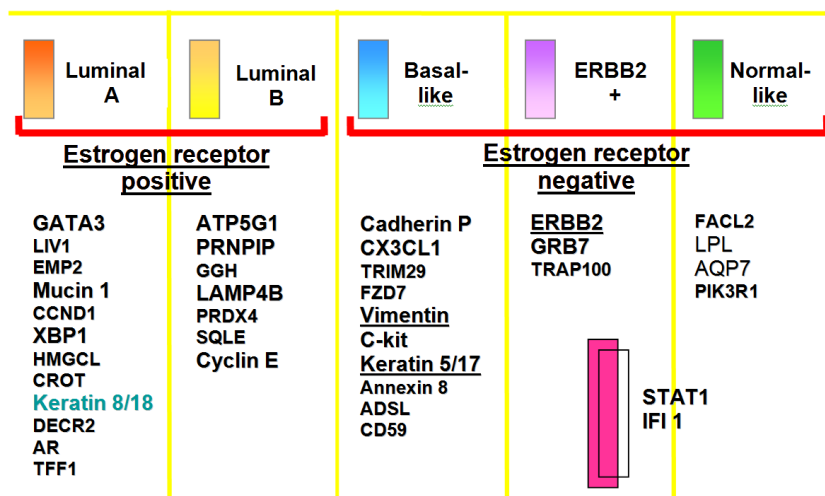


Рис. 13. Молекулярно-биологические подтипы карциномы молочной железы

Клинически Luminal A и Luminal B подтипы рассматриваются как однородная ER+ группой опухолей. Однако молекулярно-

биологические исследования профиля карцином показали, что случаи с ER+ экспрессией рецепторов рака молочной железы представляют собой различные по биологическим свойствам заболевания. Генетические исследования (сравнение Luminal A и Luminal B подтипов) показали, что фенотип Luminal B более агрессивен. Для ER+ случаев можно считать суррогатными те Luminal B случаи, опухолевые клетки которых PR отрицательны. Кроме того, опухоли такого подтипа обладают высокой пролиферацией и не всегда отвечают на гормональную терапию. В то время как Luminal A карциномы экспрессируют рецепторы ER, Luminal B не имеют эстроген-регулируемых генов, поэтому используют иные пути своего развития. Современный каталог мутаций показывает, что для своего развития Luminal B опухоли могут задействовать рецепторы фактора роста (HER-2, EGFR) а также путь PI3K/Akt/mTor [McLendon et al., 2008].

HER-2 подтип характеризуется высокой экспрессией гена HER-2 на клетках опухоли и регулируется с помощью сигнальных путей, связанных с HER-2. Этому подтипу свойственна гиперэкспрессия генов, ответственных за клеточную пролиферацию. Для таких опухолей не характерны кластеры Basal-like генов, однако в нем можно обнаружить часть генов Luminal рака молочной железы. Большинство из таких опухолей имеют высокую пролиферацию [Parker et al, 2009].

Тройной негативный рак молочной железы характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов, слабой выраженностью рецепторов Her2/neu, однако его рост контролируется посредством Ras / MAPK / MAPK-киназы (MEK) пути.

Считается, что рецепторный аппарат опухолевых клеток состоит из нескольких частей: лиганда (небольшие молекулы, синтезируемые в тканях организма или пептиды, выделяемые эндокринными) [Moran, Suster, 2007], и самих рецепторов, находящихся на мембране клеток (рецепторы HER-2/neu) либо в клеточном ядре (Estrogen receptor, Progesterone receptor, Ki-67). Именно поэтому при гистохимическом исследовании мы наблюдаем избирательную экспрессию в клетке опухоли: мембранное окрашивание при изучении рецепторов HER2 и ядерное окрашивание в реакции на рецепторы к стероидным гормонам.

### **3.4.1. Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии рецепторов к стероидным гормонам**

Именно рецепторный аппарат клеток играет важную биологическую роль в происхождении опухолей. В большинстве опухолевых клеток экспрессируются рецепторы родительских клеточных линий, отвечающих за их физиологические функции [Riggs, Hartmann, 2003]. Например, рецепторы эстрогена играют важную роль в функционировании молочных желез. Через соответствующие рецепторы, эстроген стимулирует рост органа, регуляцию физиологических функций клеток. Многие рецепторы принимают участие в процессах канцерогенеза и роста опухоли. Считается, что экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона в клетках влияет на развитие карциномы молочной железы [Clemons, Goss, 2001].

На сегодняшний день известно три механизма пролиферативного действия эстрогенов на молочную железу. К ним относятся прямой механизм, в результате которого происходит стимуляция клеточной пролиферации за счет взаимодействия комплекса эстроген – эстрогеновый рецептор с ядерной ДНК; непрямой механизм, при котором эстроген стимулирует синтез факторов роста, участвующих в сигнальных путях, ответственных за пролиферацию; механизм, обеспечивающий стимуляцию клеточного роста за счет отрицательной обратной связи, при которой эстроген блокирует эффекты ингибирующих факторов роста.

В реализации второго механизма (опосредованно, через активацию факторов роста), при котором происходит стимуляция пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток молочной железы, а также ингибирование апоптоза, принимают участие такие факторы роста и протоонкогены, как эпидермальный фактор роста (ЭФР), инсулинподобные факторы роста типов I и II (ИПФР-I и ИПФР-II),  $\alpha$ -трансформирующий фактор роста (ТФР- $\alpha$ ) и протоонкогены: c-fos, c-myc, c-jun. Во многих карциномах уровень экспрессии рецепторов сопоставим с таковым в нормальных (интактных) тканях. По всей вероятности, регуляция опухолевого роста в таких случаях происходит при участии других факторов, влияющих на клеточный рост и пролиферацию [Dickson, Stancel, 2000].

Считается, что прогестерон поддерживает циклическую пролиферацию молочных желез в нормальном менструальном цикле и в течение беременности. Общепринятым является факт, что прогестерон ингибирует рост эндометрия, но стимулирует рост эпителия молочных желез [Hilaire et al, 2011].

Прогестерон способен оказывать регулирующее действие на молочную железу, потенциально видоизменяя ответ как нормальных, так и раковых клеток молочной железы на различных уровнях [Faneyte et al, 2003; Gerdes et al, 1991]. Действие прогестерона опосредовано стимуляцией продукции 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы и эстрон-сульфотрансферазы, которые быстро окисляют E2aE1 и затем, связывая эстрон, превращают его в неактивный эстрона-сульфат; участием в созревании и дифференцировке эпителия альвеол, который подвергается дальнейшему клеточному делению; down-регуляцией эстрогеновых рецепторов в эпителии молочной железы и обеспечение снижения пролиферации клеток, стимулированной эстрогенами; модуляция апоптоза клеток молочной железы посредством p53-супрессора опухоли; модулированием митогенных протоонкогенов, таких как C-myc и C-fos [Семиглазов и соавт., 2003].

Число эстрогеновых рецепторов в эпителии молочных желез снижается в лютеиновой фазе цикла, в то время, как число прогестероновых рецепторов остается высоким в течение всего цикла [Soderqvist et al, 1997]. При иммуноцитохимическом исследовании аспирата, полученного из “нормальной” молочной железы, также установлена более выраженная пролиферация в лютеиновой фазе цикла, чем в фолликулиновой [Shoker et al, 1999]. При этом отмечена прямая корреляция активности пролиферации с уровнем прогестерона крови. Очевидность синергического влияния эстрогенов и прогестерона *in vitro* показана в исследованиях “нормальной” ткани молочной железы, полученной при биопсии, взятой рядом с фибroadеномой или раком. У женщин с регулярным циклом установлен максимум пролиферации эпителиальных клеток молочной железы в лютеиновую фазу на фоне высокого уровня прогестерона [Clahsen et al, 1999; Goulding et al, 1995].

Некоторые авторы полагают, что эстроген-прогестероновая циклическая пролиферация может способствовать аккумуляции генетических ошибок, которые, возможно, ведут к развитию рака молочной железы [Hilaire et al, 2011].

Культура эпителиальных клеток молочной железы (*in vitro*) реагирует подобно эндометрию, а именно пролиферирует под влиянием эстрогенов, при добавлении прогестерона развитие прекращается (Going et al, 1988).

В последние годы растет число данных о том, что вводимый в организм прогестерон может оказывать влияние на пролиферацию эпителия молочных желез, подобное таковому на эндометрий, а

именно тормозит эстрогенный эффект. Проведенные исследования доказывают ингибирующий эффект прогестерона на пролиферацию клеток молочных желез. При воздействии прогестерона блокируются активаторы пролиферации Id-1 и c-myc, а также усиливается экспрессия ингибитора пролиферативной активности p 21. [Chang et al, 1999; Nicholson et al, 1993, Nicholson et al, 1993].

Синтетические аналоги прогестерона могут давать проапоптический эффект посредством воздействия на антиапоптический белок bcl-2, снижая его экспрессию, даже в присутствии эстрадиола [Gombel et al, 1986].

Крайне важна длительность воздействия прогестерона на молочную железу. Так, назначение комбинации эстрогенов и прогестерона в течение 14 дней приводит к снижению пролиферации эпителия [Ferguson, Anderson, 1981]. Однако со временем комбинированное лечение способствует снижению числа клеток с эстрогеновыми и прогестероновыми рецепторами. Клинические наблюдения показывают, что длительное назначение прогестерона обеспечивает ингибирующее влияние их на молочную железу [Сметник, 2000].

В исследовании, выполненном с привлечением в него 1150 женщин в перименопаузе с доброкачественными заболеваниями молочных желез, леченных производными 19-норстероидов, отмечено снижение риска рака молочных желез на 52% (относительный риск 0,40) [Pinder, 1995].

Изложенные выше данные о влиянии половых гормонов не являются физиологическим обоснованием роли стероидных гормонов в патогенезе рака молочной железы исходя из их пролиферативной и митотической активности в лютеиновой фазе цикла [Аникеева, 2006; Должиков и соавт., 2007]. Тем не менее, принято считать, что эстрогены играют важную роль в развитии рака молочной железы (рис. 14) [Mohibi, et al, 2011].

Приблизительно 2/3 случаев рака молочной железы гормонально-зависимые. Поэтому определение рецепторов к половым гормонам в удаленной опухолевой ткани очень важно для выбора тактики лечения и суждения о прогнозе.

Крайне недостаточны данные о возможном дифференцированном влиянии эстрогенов и прогестеронов на рецепторный аппарат клеток рака молочной железы. Поскольку эстроген является одним из наиболее важных факторов роста и развития рака молочной железы, блокада его действия составляет одну из основных целей лечения рака молочной железы.



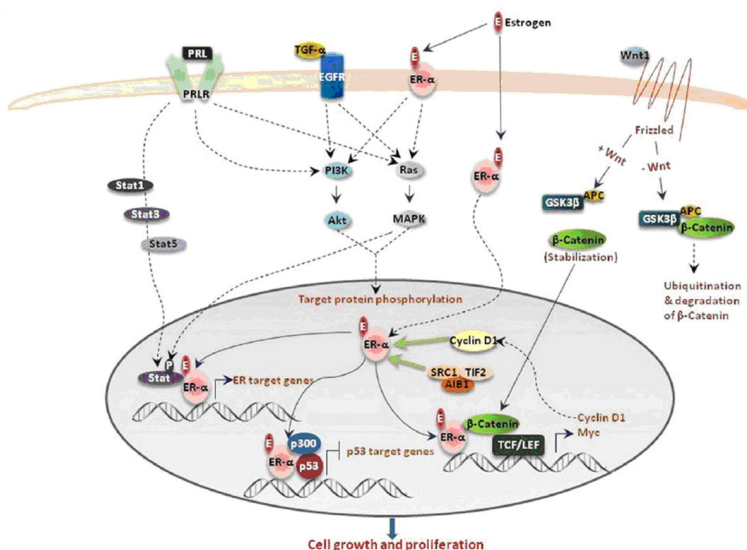


Рисунок 14. Механизм воздействия стероидных гормонов на развитие рака молочной железы [Mohibi, et al., 2011]

Имеются сведения свидетельствующие о том, что ткани рака молочной железы содержат все ферменты, необходимые для образования эстрогена из циркулирующих в крови предшественников, включая сульфатазу, ароматазу и 17b-HSD [Moriki et al, 1996; Parise, 2007; Pasqualini, Chetrite, 2008]. Ткани рака молочной железы также обладают способностью образовывать сульфаты эстрогена из несвязанных эстрогенов. Роль ферментов в локальном обмене эстрогенов в опухолевой ткани молочной железы чрезвычайно важна. Ткань молочной железы обладает способностью автономно накапливать различные метаболиты половых стероидов и/или других веществ, несмотря на то, что уровни эстрогенов в крови женщин в постменопаузе низкие, т.е. происходят локальные изменения стероидогенеза. Потенциальная способность прогестерона контролировать митозы и активность опухолевых клеток молочной железы объясняются несколькими механизмами, которые суммировал B.G. Wren [Weikel et al, 1991]. К ним относятся увеличение активности ферментов 17b-HSD и эстрон сульфотрансферазы, способствующих постоянной конверсии E2 E1 и связыванию эстрона в относительно неактивный E1S; индукция клеточного созревания и редукция клеточных митозов *in vivo*; уменьшение количества эстрогеновых рецепторов и, как следствие, снижение способности эстрогена вызывать



митозы; снижение продукции протоонкогенов, таких как C-тус и C-fos; снижение продукции катепсина Д (фактор роста опухолевых клеток) [Сметник, 2000].

До сих пор ведутся споры о том, какие гормоны играют ведущую роль в карциногенезе: эстроген или прогестерон, или их комбинация. Полагают, что избыточное клеточное деление является основой для развития злокачественного фенотипа [Kleinsmith et al, 2010].

Различают 2 фазы клеточного цикла: интерфаза (G1, синтез ДНК и S-фаза, G2) и митоз. Клетки могут оставить клеточный цикл и войти в фазу покоя - Go, из которой могут повторно входить в клеточный цикл. Также клетки могут пройти клеточный цикл с последующим вхождением в необратимую программу дифференциации.

В опухолевых клетках молочной железы прогестерон влияет на клеточный цикл по-разному. Прогестерон может оставить клеточный цикл, который может перейти в фазу покоя или Go-фазу, из которой опять войти в клеточный цикл. В порядке альтернативы клетки могут оставить клеточный цикл с целью вхождения в необратимую программу клеточной дифференциации.

Митогенный эффект эстрогенов осуществляется в раннюю G1-фазу. Прогестерон ингибируют клеточный цикл в ранней G1-фазе и ускоряет клеточный цикл в поздней G1-фазе. Таким образом, действие прогестерона осуществляется внутри G1-фазы [Бобров и соавт., 2008].

Таким образом, степень развития и дифференцировки молочной железы имеет важное значение для оценки реализации канцерогенеза. Эстрогены оказывают свое влияние путем связывания с  $\alpha$ - и  $\beta$ -эстрогеновыми рецепторами.

Прогестерон участвует в развитии рака молочной железы через ингибиторный механизм влияния на клеточную пролиферацию, осуществляемый путем торможения G1-фазы и заключительной дифференцировки. Влияние прогестерона проявляется в поддержке геномической стабильности ДНК и их взаимодействия внутри G1/S-перехода клеточного цикла.

Как сказано выше, стероидные гормоны могут оказывать прямое и опосредованное стимулирующее и ингибирующее влияние на клеточную пролиферацию. Для понимания более тонких механизмов регуляции клеточной пролиферации стероидными гормонами и их роли в каскаде сигнальных путей, вовлеченных в канцерогенез необходимы дальнейшие исследования [Сметник, 2000].

Уровень экспрессии Estrogen receptor и Progesterone receptor во

всех референс-лабораториях оценивается по шкале от 0 до 8 баллов [Alledge, et al, 2000]. Данная шкала (см. рис.15) учитывает как количество клеток, ядра которых экспрессируют Estrogen receptor и Progesterone receptor (PS) по шкале от 0 до 5, так и интенсивность окраски, степень экспрессии (IS) по шкале от 0 до 3.

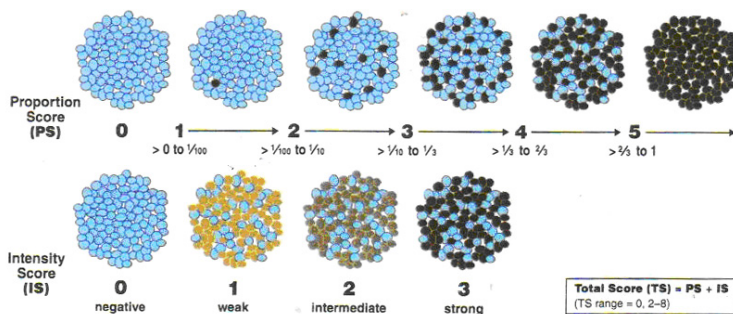


Рис.15 Шкала оценки уровня экспрессии рецепторов в ядрах клеток при РМЖ (Allred Scoring Guideline)

Расчетный интегративный показатель (TS) позволяет определить исследуемый случай в одну из четырех основных групп: в группу с уровнем экспрессии 0 баллов (полное отсутствие окрашенных ядер, индекс = 0), группу со слабым уровнем окраски (индекс от 2 до 4 баллов), группу со средним уровнем экспрессии (индекс от 5 до 6 баллов) и группу с высоким уровнем экспрессии (индекс составляет от 7 до 8 баллов). Важным является тот факт, что уровень экспрессии рецепторов связан с разной чувствительностью клеток опухоли к воздействию на них женских половых гормонов и разной чувствительностью опухоли к назначаемой гормональной терапии.

При проведении исследований желательно пользоваться только реагентами сертифицированными для диагностики, а также строго соблюдать предписанные производителями антител и наборов протоколы и рекомендации. Постановка ИГХ исследования с применением иммуноавтостейнера в значительной мере позволяет стандартизировать проведение реакций, обеспечивать воспроизводимость получаемого результата. Наличие в референс-лаборатории иммуноавтостейнера и использование современных протоколов проведения исследования в настоящее время крайне желательно, что отражено и в требованиях ASCO/CAP к патоморфологической лаборатории: Использование стандартизованных процедур обработки материала, Использование стандартизованных методов ИГХ и ИНС исследования.

## **Этапы протокола:**

**1. Подбор парафинового блока.** Для ИГХ исследования отбираются случаи, когда пациенткам не проводили химиотерапии и лучевой терапии. Проводка и заливка в парафин осуществляются по общепринятым схемам. Необходимо помнить, что для получения стабильных результатов проведения ИГХ исследований в качестве фиксаторов материала при изготовлении парафинового блока необходимо использовать 10-12% нейтральный забуференный формалин. Имея гистологические стекла с обзорной окраской нужно выбрать соответствующий блок, в срезе которого имеются структуры, подлежащие ИГХ исследованию.

**2. Получение гистологических срезов** с парафиновых блоков, как при обычной гистологии (основные правила разобраны выше) непосредственно перед проведением иммуногистохимического исследования. Толщина среза должна составлять около 4 мкм. Приготовленные на микротоме срезы монтируют на стекла, высушивают, депарафинируют и регидратируют. Для обеспечения целостности среза удобнее использовать готовые к использованию предметные стекла с полилизиновым покрытием. Полученный препарат высушивают при комнатной температуре в течение 12-18 час. или для ускорения процесса его можно поместить на 1 ч. в термостат с температурой 60°C.

**3. Предобработка парафиновых срезов** для иммуногистохимии начинается с удаления парафина и воды из срезов с использованием ксилола и этанола (как для обычной гистологии). Следует все время заменять использованные реагенты на свежие, т.к. плохое удаление парафина из среза будет приводить к нарушению окрашивания или минимум к усилению неспецифического фона при ИГХ окраске.

**4. Демаскировка антигенов.** Выполняется с использованием нагревания гистологического среза в цитратном буфере (Target Retrieval Solution) в результате чего происходит восстановление антигенной активности образца. Проводится или в водяной бане или в микроволновой печи или в РТ модуле предобработки автостейнера или в самом автостейнере, оснащенный этой функцией. Удобством последнего варианта является ненужность переноса стекол из модуля в автостейнер, при этом весь процесс осуществляется в автоматическом режиме. Кроме того, при использовании современных автостейнеров (пример Ventana) с интегрированным модулем предобработки срезов растворы одновременно позволяют выполнить все указанные выше манипуляции 3 и 4 этапов. Однако нужно внима-

тельно относиться к применению таких растворов: вовремя производить их замену, осуществлять постоянный мониторинг качества проводимых процедур по контрольным срезам.

Необходимо обратить внимание:

4.1. на pH TRS буфера в зависимости от используемого в дальнейшем первичного антитела. Так при использовании антител к Estrogen и Progesterone должны использоваться растворы с высоким pH (pH 9,0. Желательно буфер приобретать в лабораторию готовый к использованию (RTU), концентрированный, требующий только разведения водой в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2. температура восстанавливающего раствора должна достичь 97–99°C. Т.о. стекла помещаются в раствор комнатной температуры, затем начинается нагрев (который длится около 20 мин.) и время обработки учитывается только после достижения заданной температуры.

4.3. после достижения заданной температуры время инкубации срезов в растворе должно составить 20 мин.

4.4. после прохождения заданного времени обработки стекол буфер остывает (около 20 мин.), после чего стекла переносятся для проведения ИГХ исследования.

### **5. Промывка стекол в буфере.**

5.1. Стекла достают из раствора предподготовки и переносят в промывочный буфер на 2 мин.

5.2. Срезы достают из буфера, слегка подсушивают, удаляя излишки буфера (не до высыхания!),

5.3.1. при ручном способе выполнения ИГХ исследований – обводят гидрофобным карандашом вокруг среза (для предотвращения растекания реагентов).

5.3.2. при автоматизированном – стекла в кассетах сразу же помещают в автостейнер.

**6. Блок эндогенной пероксидазы.** Гистологические срезы помещаются в блокирующий раствор (Peroxidase-Blocking Solution, 3% водный раствор перекиси водорода при комнатной температуре на 5 мин.

**7. Промывка срезов в буфере.** Срезы на 5 мин. помещают в промывочный буфер. Наиболее часто для этой цели используют TBS-буфер pH 7,0-7,6. Буфер можно приготовить самостоятельно в лаборатории, однако значительно проще его приобрести уже в готовом виде.

**8. Нанесение первичных антител.** На область расположения гистологического среза наносится 100 мкл раствора первичных ан-

тител к соответствующему рецептору. Антитела предварительно должны быть разведены до рабочей концентрации в соответствии с рекомендациями производителя. В нашей лаборатории для выявления рецепторов Estrogen и Progesterone на ядрах клеток опухоли используются моноклональные мышиные антитела Monoclonal Mouse Anti – Human Estrogen Receptor (Clone SP1) и Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor (Clone SP2). Инкубация первичных антител продолжается 30 мин. при комнатной температуре.

**9. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, однако не допуская его высыхания.

**10. Инкубация с применением визуализационной системы.** В соответствии с инструкцией по использованию на гистологический срез наносится 100 мкл. визуализирующего реагента 2-step polimer conjugate. Необходимо проверить соответствие визуализационной системы и используемого антитела. В своей работе мы используем универсальную визуализационную систему, которая позволяет одновременное использование как мышиных так и кроличьих первичных антител, что полностью исключает возможность ошибки соответствия. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации — 30 мин.

**11. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в промывочном TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, не допуская его высыхания.

**12. Инкубация с хромогеном.** Непосредственно перед постановкой реакции готовят рабочий раствор хромогена (из расчета 20 мкл (1 капля) на 1 мл субстрата) с учетом расхода 100 мкл на один гистологический срез. Чаще всего в ИГХ реакциях используется DAB Chromogen, связывающийся с комплексом используемой визуализационной системы с образованием нерастворимого осадка и обеспечивающий интенсивное коричневое окрашивание непосредственно у изучаемых структур. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации – 10 мин.

**13. Промывка среза** в дистиллированной воде, его ополаскивание.

**14. Подкраска ядер.** Для дифференцировки структур в срезе обычно докрашивают ядра клеток гематоксилином. Для этого используют основной краситель, чаще всего гематоксилин (Mayer's Hematoxylin, Lillie's Modification), который дает синее окрашивание без фиолетовых оттенков, что облегчает интерпретацию ИГХ реакции в последующем.

**15. Заключение ИГХ среза.** Гистологические срезы дегидратируют (проводят по спиртам удаляя воду), просветляют (проводя через ксилолы) и заключают в бальзам или синтетическую среду. Гистологические срезы, закрытые покровными стеклами с применением синтетических сред можно оценивать уже через 30 мин.

**16. Оценка результата ИГХ окрашивания.** Осуществляется в соответствии с принципами Allred Scoring Guideline для рака молочной железы. Принимается во внимание только ядерная окраска. Окрашивание ядер клеток оценивается только в клетках опухоли. Нормальные структуры молочной железы являются внутренним положительным или отрицательным контролем, на что обязательно необходимо обращать внимание.

### **Необходимые для ИГХ исследования внешние контроли:**

#### ***Положительный контроль антигена***

В качестве положительного контроля используются срезы, в которых заранее точно известно наличие исследуемого антигена – гистологический срез слизистой влагалища.

#### ***Отрицательный контроль антигена***

В качестве отрицательного контроля используют срезы, про которые заранее точно известно, что в них определяемый антиген отсутствует – для примера гистологический срез лимфатического узла

#### ***Отрицательный контроль антител***

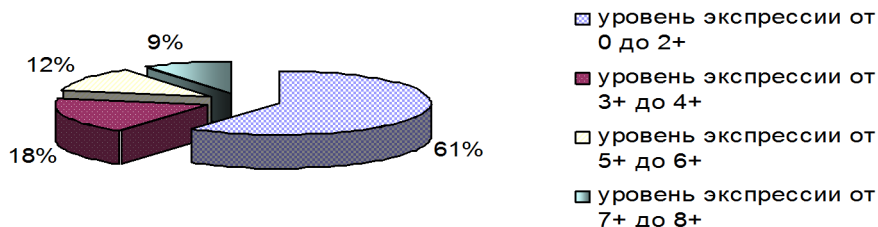
Для постановки этого контроля следует использовать один из препаратов обрабатываемой серии. Вместо первичных антител в соответствующих пунктах протоколов обработки на срезы необходимо нанести разбавитель антител. В таком контроле при окраске положительная реакция должна отсутствовать. Наличие положительной реакции свидетельствует о неспецифичности окраски, причем за счет некачественных реактивов или (в значительно меньшей степени) грубых нарушений протокола ИГХ окрашивания.

**Результаты ИГХ реакции для оценки уровня экспрессии Estrogen и Progesterone Receptor клетками рака молочной железы от 406 пациенток.** Сформированы четыре группы: в первую группу вошли карциномы 243 пациенток с минимальной экспрессией рецепторов эстрогена (уровень экспрессии от 0 до 2). Вторая группа включала в себя 75 случаев со слабой экспрессией рецепторов



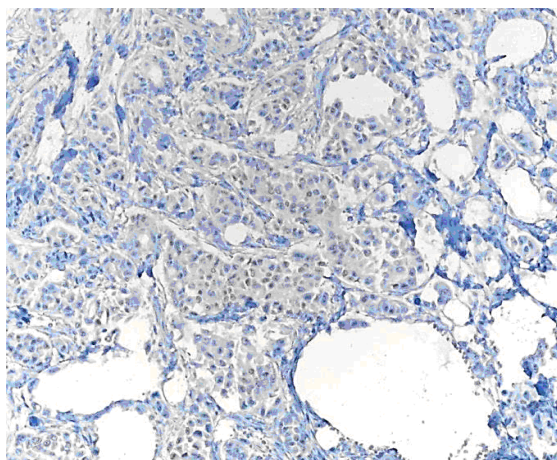
эстрогена (уровень от 3 до 4). Средний уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов (от 5 до 6) обнаружен в 50 случаях, которые составили третью группу. Сильная экспрессия рецепторов эстрогена представлена в четвертой группе (уровень от 7 до 8), в которую вошли 38 исследованных случаев.

Процентное соотношение между группами представлено на рисунке 16.



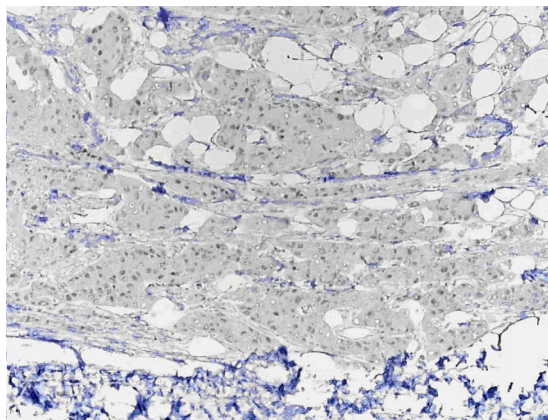
*Рис. 16. Распределение пациентов с раком молочной железы в соответствии с уровнем экспрессии Estrogen receptor (в %)*

В результате проведенного анализа оказалось, что только около 40% исследованных карцином экспрессировали Estrogen receptor, в остальных случаях экспрессия отсутствовала (Рис. 17, 18, 19, 20) [Бриллиант и др., 2011].



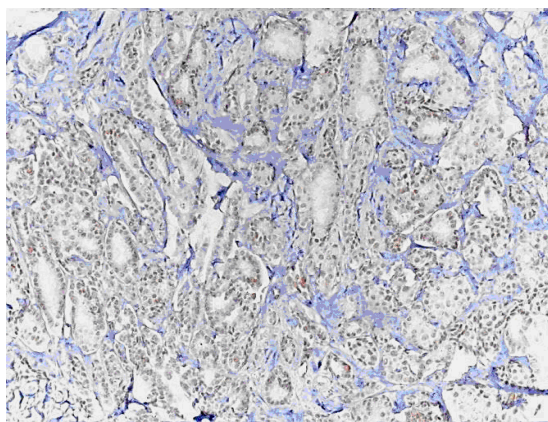
*Рис.17. Инвазивный рак молочной железы с отрицательной реакцией Estrogen receptor на клетках опухоли (TS=0) . ×100.*

*Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майер*



*Рис. 18. Инвазивный рак молочной железы со слабой степенью экспрессии Estrogen receptor на клетках опухоли (TS=4). ×100.*

*Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майер*



*Рис. 19. Инвазивный рак молочной железы с средней степенью экспрессии Estrogen receptor на клетках опухоли (TS=6). ×100.*

*Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майер*



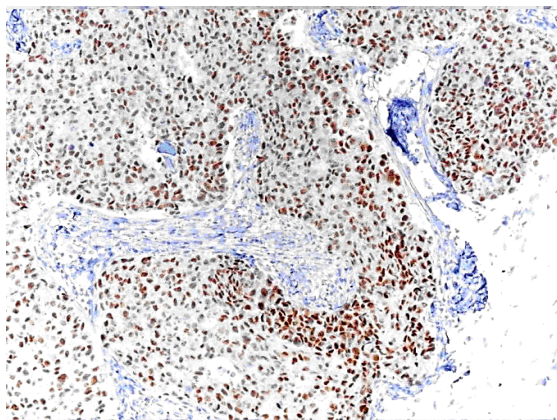


Рис. 20. Инвазивный рак молочной железы с максимальной степенью экспрессии *Estrogen receptor* на клетках опухоли (TS=7).  $\times 100$ .

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майер

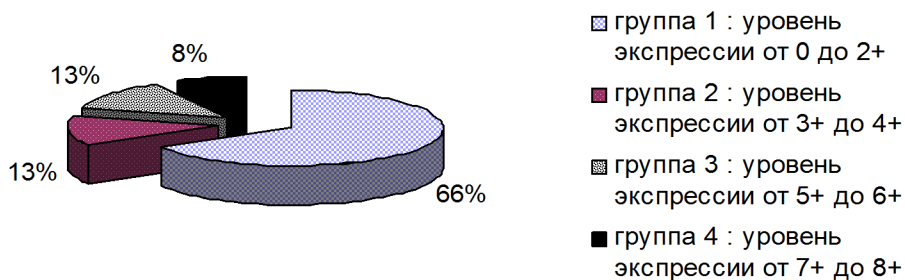


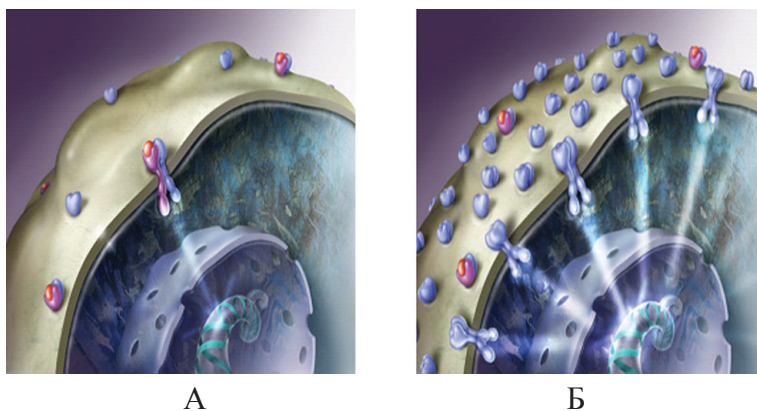
Рис. 21. Распределение пациентов с раком молочной железы в соответствии с уровнем экспрессии *Progesterone receptor* (в %)

При анализе полученных данных экспрессии *Progesterone receptor* выяснилось, что большинство исследованных карцином не экспрессируют рецепторы прогестерона [Бриллиант и др., 2012]. Положительная реакция обнаружена только в 34% случаев (Рис. 21).

### 3.4.2. Постановка иммуногистохимического исследования HER2 neu (c-erbB2 Oncoprotein) (рекомендуемый протокол):

Ген *Her2/neu*, расположенный на длинном плече хромосомы 17 (17q12–q21), кодирует трансмембранный протеин массой 185 кДа с выраженной тирозинкиназной активностью [Pritchard et al., 2006].

Белковый продукт гена относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), вовлеченных в активацию сигнальных путей при регуляции нормального и опухолевого роста ткани молочной железы (рис. 22, 23). HER2/neu-тирозинкиназный трансмембранный рецептор из семейства ERBB, состоящего из четырех функционально связанных рецепторных молекул, играющих важную роль в клеточной дифференцировке, пролиферации, апоптозе. Под действием лигандов HER2/neu образует гетеродимеры с другими рецепторами данного семейства и регулирует работу соответствующих сигнальных каскадов [Cobleigh et al., 1997, De Placido et al., 1998]. HER2/neu экспрессируется в небольшом количестве и в клетках нормальных тканей. Однако в процессе злокачественного роста происходит его гиперэкспрессия и/или амплификация кодирующего его гена, что доказывается только специальными методами исследования. Гиперэкспрессия протоонкогена Her2/neu является распространенным генетическим нарушением при раке молочной железы, при использовании иммуногистохимического метода исследования определяется почти у 20% пациенток с РМЖ [Coussens et al., 2005, Di Augustine et al., 2009, Owens et al., 2004].



*Рис. 22. Принципиальная схема, отражающая различный уровень экспрессии рецепторов HER2 на клеточной плазмолемме на нормальных (А) и опухолевых клеток (Б).*

Гиперэкспрессия Her2/neu относится к важным прогностическим маркерам и предопределяет более частое рецидивирование, снижение показателя выживаемости у больных с впервые выявленным РМЖ. Данные о статусе рецептора Her2/neu могут помочь

принять оптимальное решение при выборе схем адъювантной терапии и прогнозировать эффективность противоопухолевых препаратов. Пациенты с повышенной экспрессией Her2/neu характеризуются худшим ответом на гормональную [De Placido et al., 1998, Ross et al., 1999] и цитостатическую терапию, не включающую антрациклиновые антибиотики [Owens et al., 2004, Piccart-Gebhart et al., 2005]. В то же время таксаны, наряду с антрациклинами, демонстрируют хорошую эффективность как при первичном, так и метастатическом Her2/neu-позитивном РМЖ [Konecny et al., 2004, Pritchard et al., 2006, Thor et al., 1998, Vogel et al., 2002].

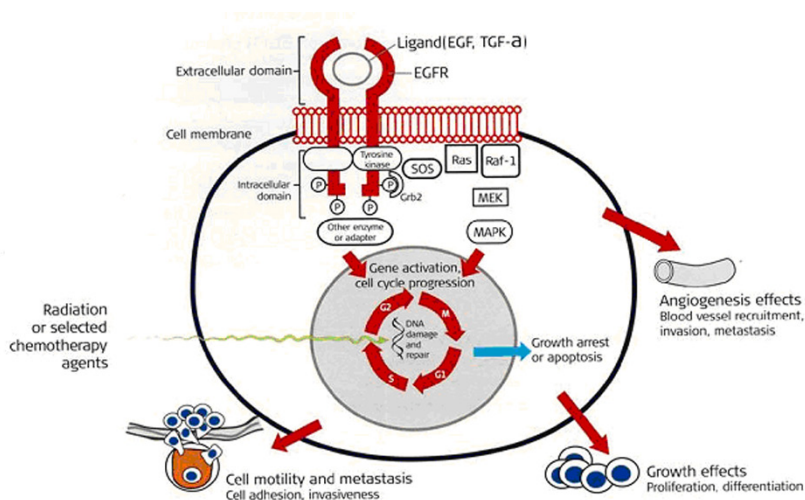


Рис. 23. Механизмы регуляции роста и пролиферации опухолевых клеток рака молочной железы через рецептор HER2 (EGFR), по [Zarbo, Hammond, 2003].

С введением в клиническую практику трастузумаба (Герцептина) — специфического гуманизированного моноклонального антитела против Her2/neu, корректная оценка статуса этого рецептора стала ключевым моментом в принятии решения о тактике лечения пациентки с РМЖ. Так как трастузумаб специфично связывается с белком Her2/neu, оценка этой молекулы предоставляет важнейшую информацию о целесообразности назначения препарата тому или иному пациенту. Обоснованное назначение трастузумаба сопровождается повышением уровня ответа, удлинением интервала до прогрессирования заболевания и улучшением общей выживаемости при

лечении пациентов с метастатическим Her2/neu-позитивным раком [Slamon et al., 2001]. Результаты проспективных рандомизированных клинических исследований продемонстрировали, что трастузумаб на половину снижает риск рецидивирования и на треть — смертность больных с РМЖ ранних стадий [Joensuu et al., 2006, Piccart-Gebhart et al., 2005, Romond et al., 2005]. В то же время, терапия трастузумабом не лишена недостатков. Во-первых, это значительная стоимость препарата при необходимости длительной терапии. Так, адъювантная терапия герцептином в течение одного года подразумевает 17 введений 6 мг/кг (или 440 мг при весе пациентки 75 кг, стоимость одного флакона составляет 92 478 руб., 17 флаконов — 1 572 126 руб.). Во-вторых, лечение трастузумабом ассоциируется с риском кардиотоксичности. Все вместе взятое, а именно ожидаемая при Her2/neu-позитивном РМЖ высокая эффективность трастузумаба, существенная стоимость и потенциальная кардиотоксичность препарата, требует корректной оценки статуса рецептора Her2/neu. Последнее, определяет необходимость создания системы повторного тестирования наличия гиперэкспрессии HER2/neu, т.е. создание системы пересмотра результатов иммуногистохимических исследований, полученных в первой лаборатории.

При проведении ИГХ исследований с-erbB2, учитывая следующее полуколичественный учет реакции, желательно на пользоваться только реагентами сертифицированными для диагностики, а также строго соблюдать предписанные производителями антител и наборов протоколы и рекомендации. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) в ручном режиме или с использованием иммуногистостейнера рекомендуется проводить с набором реактивов, готовых к использованию (RTU).

Методы, одобренные в настоящее время и рекомендованные для использования FDA (табл. 5).

*Таблица №5*

*Коммерчески доступные наборы для проведения ИГХ для оценки экспрессии HER2 neu*

Набор	Производитель	Антитело
Ventana CONFIRM HER-2/neu 1	Roche Tissue Diagnostics	4B5
HercepTest™ 2	Dako	A0485

1. Ventana CONFIRM HER-2/neu. Available at:

[http://www.ventanamed.com/msds/files/N574%200607B\\_](http://www.ventanamed.com/msds/files/N574%200607B_)

Постановка ИГХ исследования HER2 neu с применением иммуноавтостейнера в значительной мере позволяет стандартизировать проведение реакций, обеспечивать воспроизводимость получаемого результата. В своей работе лаборатория должна руководствоваться требованиями, сформулированными ASCO/CAP к патоморфологической лаборатории [цит. по Завалишина и др. 2011]:

1. Использование стандартизованных процедур обработки материала.
2. Использование стандартизованных методов ИГХ и ИНС исследования.
3. Внешний контроль качества. (Необходима 95% конкордантность с позитивными и негативными случаями.)
4. Конкордантность FISH и ИНС 90% для ИНС 0 и 3+ и 95% для ИНС 1+
5. Минимальное количество исследований в год: ИНС – 250, FISH – 100.

#### **Этапы протокола:**

**1. Подбор парафинового блока.** Для ИГХ исследования HER2 neu отбираются случаи, когда пациенткам не проводили предоперационной химиотерапии и лучевой терапии. Пациенткам при планировании лечения с предоперационной терапией необходимо выполнить толстоигольную трепанобиопсию и провести иммуногистохимическое исследование на этом материале. Проводка и заливка в парафин осуществляются по общепринятым схемам. Необходимо помнить, что для получения стабильных результатов проведения ИГХ исследований в качестве фиксаторов материала при изготовлении парафинового блока необходимо использовать 10-12% нейтральный забуференный формалин. Имея гистологические стекла с обзорной окраской нужно выбрать соответствующий блок, в срезе которого имеются инфильтративный компонент опухоли.

Проведение исследования на цитологическом материале не допускается.

В случае отсутствия материала первичной опухоли возможна оценка гиперэкспрессии на метастатических лимфатических узлах, т.к. в большинстве случаев HER2-статус в метастазах опухоли обыч-

но сохраняется.

**2. Получение гистологических срезов** с парафиновых блоков, производится как при обычной гистологии (основные правила сформулированы выше) непосредственно перед проведением иммуногистохимического исследования. Толщина среза должна составлять около 4 мкм. Приготовленные на микротоме срезы монтируют на стекла, высушивают, депарафинируют и регидратируют. Для обеспечения целостности среза удобнее использовать готовые к использованию предметные стекла с полилизиновым покрытием. Полученный препарат высушивают при комнатной температуре в течение 12-18 час. или для ускорения процесса его можно поместить на 1 ч. в термостат с температурой 60°C.

**3. Предобработка парафиновых срезов** для проведения ИГХ исследования HER2 neu начинается с удаления парафина и воды из срезов с использованием ксилола и этанола (как для обычной гистологии). Следует все время заменять использованные реагенты на свежие, т.к. плохое удаление парафина из среза будет приводить к нарушению окрашивания или минимум к усилению неспецифического фона при ИГХ окраске.

**4. Демаскировка антигенов HER2 neu** выполняется с использованием нагревания гистологического среза в цитратном буфере (Target Retrieval Solution) в результате чего происходит восстановление антигенной активности образца. Проводится или в водяной бане или в микроволновой печи или в РТ модуле предобработки автостейнера или в самом автостейнере, оснащенный этой функцией. Удобством последнего варианта является ненужность переноса стекол из модуля в автостейнер, при этом весь процесс осуществляется в автоматическом режиме. Кроме того, при использовании современных автостейнеров (пример Ventana) с интегрированным модулем предобработки срезов растворы одновременно позволяют выполнить все указанные выше манипуляции 3 и 4 этапов. Однако нужно внимательно относиться к применению таких растворов: вовремя производить их замену, осуществлять постоянный мониторинг качества проводимых процедур по контрольным срезам.

Необходимо обратить внимание:

4.1. на pH TRS буфера в зависимости от используемого в дальнейшем первичного антитела. Так при использовании антител к Her2 neu должны использоваться растворы с низким pH (pH 6,0). Желательно буфер приобретать в лабораторию готовый к использованию (RTU), концентрированный, требующий только разведения водой в



соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2. температура восстанавливающего раствора должна достичь 97-99°C. Т.о. стекла помещаются в раствор комнатной температуры, затем начинается нагрев (который длится около 20 мин.) и время обработки учитывается только после достижения заданной температуры.

4.3. после достижения заданной температуры время инкубации срезов в растворе должно составить 40 мин.

4.4. после прохождения заданного времени обработки стекол буфер остывает (около 20 мин.), после чего стекла переносятся для проведения ИГХ исследования.

Артефакты, связанные с неадекватной подготовкой материала, могут приводить к ошибочной интерпретации результатов.

### **5. Промывка стекол в буфере.**

5.1. Стекла достают из раствора подготовки и переносят в промывочный буфер на 2 мин.

5.2. Срезы достают из буфера, слегка подсушивают, удаляя излишки буфера (не до высыхания!),

5.3.1. при ручном способе выполнения ИГХ исследований – обводят гидрофобным карандашом вокруг среза (для предотвращения растекания реагентов).

5.3.2. при автоматизированном – стекла в кассетах сразу же помещают в автостейнер.

**6. Блок эндогенной пероксидазы.** Гистологические срезы помещаются в блокирующий раствор (Peroxidase-Blocking Solution, 3% водный раствор перекиси водорода при комнатной температуре на 5 мин.

**7. Промывка срезов в буфере.** Срезы на 5 мин. помещают в промывочный буфер. Наиболее часто для этой цели используют TBS-буфер pH 7,0-7,6. Буфер можно приготовить самостоятельно в лаборатории, однако значительно проще его приобрести уже в готовом виде.

**8. Нанесение первичных антител.** На область расположения гистологического среза наносится 100 мкл раствора первичных антител к соответствующему рецептору. Антитела предварительно должны быть разведены до рабочей концентрации в соответствии с рекомендациями производителя. В нашей лаборатории для выявления рецепторов HER2 neu на мембранах клеток опухоли используются моноклональные кроличьи антитела Monoclonal Rabbit Anti – Human Ventana CONFIRM HER-2/neu. Инкубация первичных ан-

тител продолжается 30 мин. при комнатной температуре.

**9. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, однако не допуская его высыхания.

**10. Инкубация с применением визуализационной системы.** В соответствии с инструкцией по использованию на гистологический срез наносится 100 мкл. визуализирующего реагента 2-step polimer conjugate. Необходимо проверить соответствие визуализационной системы и используемого антитела. В своей работе мы используем универсальную визуализационную систему, которая позволяет одновременное использование как мышиных так и кроличьих первичных антител, что полностью исключает возможность ошибки соответствия. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации – 30 мин.

**11. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в промывочном TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, не допуская его высыхания.

**12. Инкубация с хромогеном.** Непосредственно перед постановкой реакции готовят рабочий раствор хромогена (из расчета 20 мкл (1 капля) на 1 мл субстрата) с учетом расхода 100 мкл на один гистологический срез. Чаще всего в ИГХ реакциях используется DAB Chromogen, связывающийся с комплексом используемой визуализационной системы с образованием нерастворимого осадка и обеспечивающий интенсивное коричневое окрашивание непосредственно у изучаемых структур. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации — 10 мин.

**13. Промывка среза** в дистиллированной воде, его ополаскивание.

**14. Подкраска ядер.** Для дифференцировки структур в срезе обычно докрашивают ядра клеток гематоксилином. Для этого используют основной краситель, чаще всего гематоксилин (Mayer's Hematoxylin, Lillie's Modification), который дает синее окрашивание без фиолетовых оттенков, что облегчает интерпретацию ИГХ реакции в последующем.

**15. Заключение ИГХ среза.** Гистологические срезы дегидратируют (проводят по спиртам удаляя воду), просветляют (проводя через ксилолы) и заключают в бальзам или синтетическую среду. Гистологические срезы, закрытые покровными стеклами с применением синтетических сред можно оценивать уже через 30 мин., в дальнейшем они подлежат архивированию без ухудшения их качества.

**16. Оценка результата ИГХ окрашивания.** Осуществляется в



соответствии с учетом следующих принципов:

Исследование HER2 должно проводиться в лабораториях с подтвержденной квалификацией.

Все образцы опухолей молочной железы необходимо исследовать на статус HER2.

Первоначально статус HER2 необходимо рутинно исследовать методом ИГХ.

Образцы с сомнительной оценкой ИГХ ( 2+) необходимо переделывать с исследованием материала в другом блоке или исследовать методом ISH для подтверждения положительного статуса HER2.

HER2-статус оценивается только в инвазивном компоненте опухоли. Рак *in situ* оценке не подлежит, несмотря на то, что подобные структуры часто отличаются резко выраженной положительной реакцией.

Оценивается только окрашивание мембран клеток, цитоплазматическое окрашивание оценке не подлежит.

Проводится обязательное сравнение интенсивности окрашивания опухолевых и нормальных структур (внутренний контроль). При их одинаковой интенсивности окраски HER2-статус считается отрицательным.

В каждом цикле проведения ИГХ исследования необходимо использовать контрольные срезы.

### **Необходимые для ИГХ исследования внешние контроли:**

#### ***Положительный контроль антигена***

В качестве положительного контроля используются срезы, в которых заранее точно известно наличие исследуемого антигена — наиболее целесообразно использовать в виде контроля срезы с блока РМЖ с заранее известным уровнем экспрессии на 2+.

#### ***Отрицательный контроль антигена***

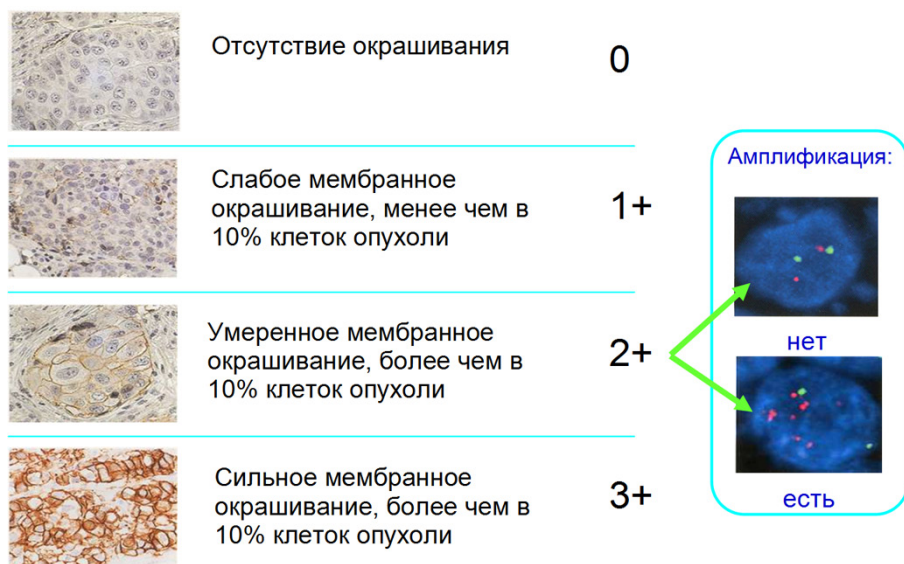
В качестве отрицательного контроля используют срезы, про которые заранее точно известно, что в них определяемый антиген отсутствует — 0.

#### ***Отрицательный контроль антител***

Для постановки этого контроля следует использовать дополнительный гистологический срез с контрольного блока 2+. Вместо первичных антител в соответствующих пунктах протоколов обработки на срезы необходимо нанести разбавитель антител. В таком контроле при окраске положительная реакция должна отсутствовать. Наличие положительной реакции свидетельствует о неспеци-

фичности окраски за счет использования некачественных реактивов или грубых нарушений протокола ИГХ окрашивания.

**Оценка результатов реакции на HER2** проводится с помощью балльной шкалы оценки, разработанной производителем теста и одобренной FDA [Завалишина, Франк, 2006]. Согласно консенсуса американских патологов и управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) [Wolff et al., 2007] система оценки результатов ИГХ-исследования экспрессии Her2/neu включает 4 категории (0, 1+, 2+, 3+); Оценка 0 баллов выставляется при полном отсутствии мембранного окрашивания или слабого окрашивания на мембранах менее чем 10% клеток опухоли, 1+ — при слабом окрашивании части мембран более чем 10% клеток опухоли, 2+ — при умеренном окрашивании мембран более чем 10% клеток опухоли или сильном окрашивании мембран менее чем 10% опухолевых клеток; и 3+ — если более 10% клеток инвазивной опухоли демонстрируют равномерное сильное окрашивание мембран (Рис. 24).

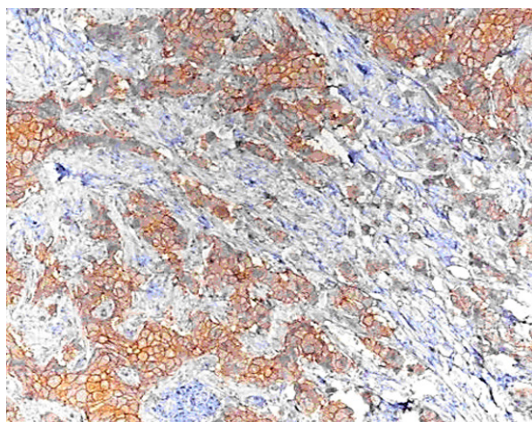


*Рис. 24. Принципиальная схема оценки уровней экспрессии HER2/neu при РМЖ*

Оценка проводится с использованием светового микроскопа, в основном при увеличении объектива 10× и лишь в пограничных

случаях 1+/2+ — объектива 20×. Если мы отмечаем реакцию более чем в 10% клеток при увеличении 20×, то такой результат оценивается как 1+ (рис. 24, 25).

HER2–статус, оцененный как 0 и 1+, следует считать негативным, т.е. гиперэкспрессия белка и амплификация гена Her-2 отсутствуют. HER2–статус, оцененный как 3+, является позитивным, т.е. гиперэкспрессия белка и амплификация гена имеются (Рис. 24, 27). При HER2–статусе 2+ (неопределенный) по экспрессии белка на основании иммуногистохимической реакции нельзя уверенно судить об амплификации гена, поэтому требуется исследование, прямо выявляющее наличие или отсутствие амплификации (Рис. 24).



*Рис. 25. Инвазивный рак молочной железы.*

*Экспрессия HER-2/neu на клетках опухоли 2+. ×100.*

*Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера*

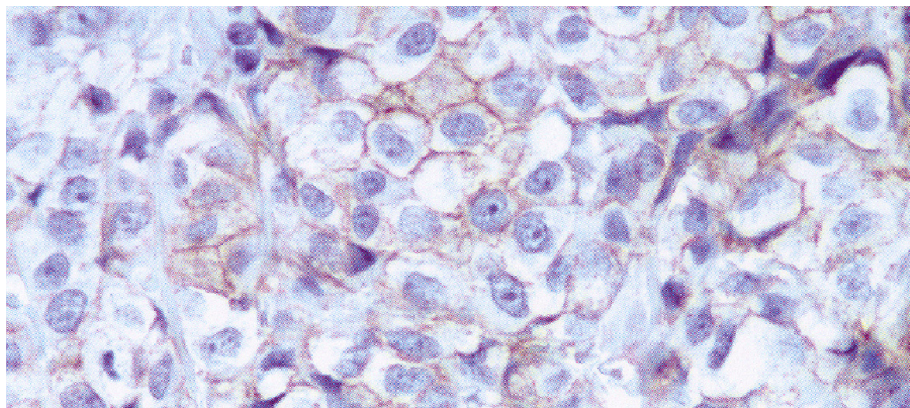


Рис.26 . Инвазивный рак молочной железы.  
Экспрессия HER-2/неи на клетках опухоли 2+. ×400.  
Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематокси-  
лин Майера

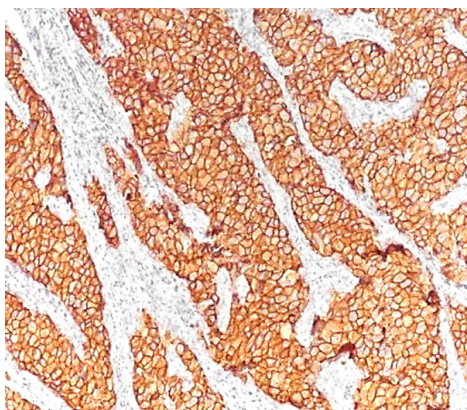


Рис. 27. Инвазивный рак молочной железы.  
Экспрессия HER-2/неи на клетках опухоли 3+. ×100.  
Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематокси-  
лин Майера

Таким методом является *in situ* гибридизация: при использовании флуоресцентной метки — FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация) и при использовании хромогенной метки — CISH (хромогенная *in situ* гибридизация) [Coussens et al., 2005]. Оба метода выполняются на срезах с того же образца (блока), на котором проводилось иммуногистохимическое исследование в референс-лаборатории.

## Результаты ИГХ реакции HER-2/neu на клетках карциномы молочной железы

При анализе данных, полученных в ходе проведенного исследования уровней экспрессии фактора роста HER-2/neu, в которое вошли 406 случаев инвазивного рака молочной железы, были сформированы четыре группы (Бриллинат и др., 2011, Сазонов и др, 2011,2013). Первую группу составили 243 случая без экспрессии фактора роста в клетках карциномы. Вторую группу составили 102 случая с уровнем экспрессии фактора роста оцененным на 1+, третью — 40 случаев с уровнем экспрессии 2+, в четвертой группе (21 случай) уровень экспрессии был оценен как 3+. Процентное соотношение между сформированными группами случаев карциномы молочной железы представлено на рис. 28.

Как видно из полученных при иммуногистохимическом исследовании данных, большее количество исследованных карцином не экспрессирует рецептор HER-2/neu. Причем из 40% карцином с наличием экспрессии по изученному показателю только 15% случаев оцениваются как HER-2 положительные (уровень экспрессии которых равен 2+ и 3+).

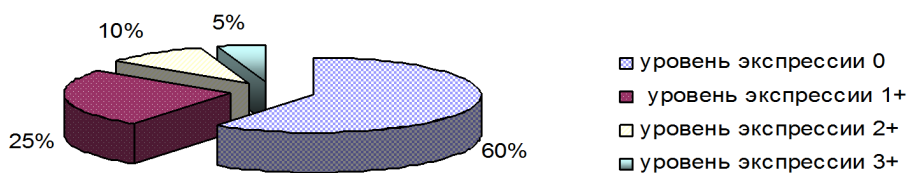


Рис. 28. Распределение пациентов с раком молочной железы в соответствии с уровнем экспрессии Her-2/neu (в %)

**Цель проводимого ИГХ исследования.** Эффективность проводимой терапии напрямую связана с особенностями молекулярно-биологических характеристик клеток РМЖ и их ответа на применяемую химиотерапию, что показано в табл. 6.

Таблица №6

Результаты ИГХ/FISH и эффективность лечения моноклональным антителом (трастузумаб) РМЖ

Экспрессия/ амплификация	Объективный ответ
ИГХ 2+ (FISH -)	0%
ИГХ 2+/3+	26%
ИГХ 3+	35%
FISH +	41%

Цит. по: Vogel et al. Proc ASCO 2000;19:Abstract 275



### **3.4.3. Постановка иммуногистохимического исследования Ki-67 (рекомендуемый протокол)**

Процессы клеточного деления, дифференцировки и апоптоза происходят как в нормальных, так и в опухолевых клетках. Последние отличаются от нормальных тем, что происходящие в ней процессы являются неконтролируемыми. Опухолевые клетки содержат набор молекул, необходимых для выживания, пролиферации, дифференцировки, апоптоза и экспрессии специфических функций. Неспособность регулировать эти процессы приводит к изменению фенотипа клеток и развитию опухоли, при этом изменяется структура рецепторного аппарата клеток (Andreeff, Goodrich, 2003).

Ki-67 впервые был обнаружен Гердесом и соавторами в 1991г. как ядерный негистонный белок. В 1993г. была найдена последовательность генов, кодирующих данный белок. Было показано, что микроинъекции антител, направленных против мышиного Ki-67 приводят к снижению скорости деления клеток [Blau, Banfi, 2001]. Аналогичные результаты были получены введением человеческих антител белка Ki-67. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что данный белок играет существенную роль в клеточной пролиферации [Scholzen et al, 1997].

Известно, что экспрессия Ki-67 меняется в пределах всего клеточного цикла. Уровень белка считается низким в течении G1 и ранней S фазе, и возрастает до максимума к митозу. В анафазе и телофазе экспрессия Ki-67 значительно снижается. Это доказывает тот факт, что белок является точным маркером роста клеточной фракции [Радюкова и соавт., 2012].

Считается, что степень пролиферации ткани карциномы молочной железы наряду с определением стероидных рецепторов имеет как прогностическое, так и предсказывающее значение. Рандомизированный многомерный анализ показал, что Ki-67 является независимым прогностическим фактором выживаемости без учета течения заболевания. На сегодняшний день существует проблема стандартизации методик и методов оценки, необходимых для интеграции биомаркера в длительное прогнозирование исхода заболевания и эффективности химиотерапии. Несмотря на это, было доказано, что случаи с высоким индексом Ki-67 дают полный ответ на применение неадьювантной терапии [Lopez, 1991].

Установлена корреляция между количеством клеток, экспрессирующих Ki-67, и степенью злокачественности опухоли, а также митотическим индексом. Penault-Llorca установил, что пациенты, опу-

холи которых экспрессируют Ki-67 более чем в 50% клеток, имеют высокий риск развития рецидива заболевания [Penault-Llorca et al, 2003].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что высокие показатели различных маркеров опухолевой пролиферации (высокий пролиферативный индекс, III степень гистологической злокачественности, уровень экспрессии Ki-67 равный или больше 20%) ассоциируются с большей вероятностью полного регресса опухоли в ответ на химиотерапию [Ernster. et al, 1996; Penault-Llorca et al, 2003]. Во многих исследованиях высокая степень гистологической злокачественности ассоциировалась с большей частотой полных морфологических регрессов после различных режимов неoadъювантной химиотерапии [Amat et al, 2002; Penault-Llorca et al, 2003; Urruticoechea et al, 2005; Вторушин и соавт., 2007].

При проведении ИГХ исследований Ki-67, учитывая значимость этого показателя для прогноза и тактики назначаемой химиотерапии желательно пользоваться только реагентами сертифицированными для диагностики, а также строго соблюдать предписанные производителями антител и наборов протоколы и рекомендации. Иммуногистохимическое исследование в ручном режиме или с использованием иммуногистостейнера рекомендуется проводить с набором реактивов, готовых к использованию (RTU).

Постановка ИГХ исследования Ki-67 с применением иммуноавтостейнера в значительной мере позволяет стандартизировать проведение реакций, обеспечивать воспроизводимость получаемого результата. В своей работе лаборатория так же должна руководствоваться требованиями, сформулированными ASCO/CAP:

Использование стандартизованных процедур обработки материала.

Использование стандартизованных методов ИГХ исследования.

Наличие внешнего контроля качества.

Наличие тренинга патологов и технологов.

Применение методов анализа изображения.

### **Этапы протокола:**

**1. Подбор парафинового блока.** Для ИГХ исследования Ki-67 желательно, чтобы пациенткам не проводили предоперационной химиотерапии и лучевой терапии. Проводка и заливка в парафин осуществляются по общепринятым схемам.

**2. Получение гистологических срезов с парафиновых блоков,**

производится как при обычной гистологии (основные правила сформулированы выше) непосредственно перед проведением иммуногистохимического исследования. Толщина среза должна составлять около 4 мкм. Приготовленные на микротоме срезы монтируют на стекла, высушивают, депарафинируют и регидратируют. Для обеспечения целостности среза удобнее использовать готовые к использованию предметные стекла с полилизиновым покрытием. Полученный препарат высушивают при комнатной температуре в течение 12-18 час. или для ускорения процесса его можно поместить на 1 ч. в термостат с температурой 60°C.

**3. Предобработка парафиновых срезов** для проведения ИГХ исследования Ki-67 начинается с удаления парафина и воды из срезов с использованием ксилола и этанола (как для обычной гистологии). Следует все время заменять использованные реагенты на свежие, т.к. плохое удаление парафина из среза будет приводить к нарушению окрашивания или минимум к усилению неспецифического фона при ИГХ окраске.

**4. Демаскировка антигенов Ki-67** выполняется с использованием нагревания гистологического среза в цитратном буфере (Target Retrieval Solution) в результате чего происходит восстановление антигенной активности образца. Проводится или в водяной бане или в микроволновой печи или в РТ модуле предобработки автостейнера или в самом автостейнере, оснащенный этой функцией. Удобством последнего варианта является ненужность переноса стекол из модуля в автостейнер, при этом весь процесс осуществляется в автоматическом режиме. Кроме того, при использовании современных автостейнеров (пример Ventana) с интегрированным модулем предобработки срезов растворы одновременно позволяют выполнить все указанные выше манипуляции 3 и 4 этапов. Однако нужно внимательно относиться к применению таких растворов: вовремя производить их замену, осуществлять постоянный мониторинг качество проводимых процедур по контрольным срезам.

Необходимо обратить внимание:

4.1. на pH TRS буфера в зависимости от используемого в дальнейшем первичного антитела. Так при использовании антител к Her2 пепс должны использоваться растворы с низким pH (pH 6,1). Желательно буфер приобретать в лабораторию готовый к использованию (RTU), концентрированный, требующий только разведения водой в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.2. температура восстанавливающего раствора должна достичь



97-99°C. Т.о. стекла помещаются в раствор комнатной температуры, затем начинается нагрев (который длится около 20 мин.) и время обработки учитывается только после достижения заданной температуры.

4.3. после достижения заданной температуры время инкубации срезов в растворе должно составить 40 мин.

4.4. после прохождения заданного времени обработки стекол буфер остывает (около 20 мин.), после чего стекла переносятся для проведения ИГХ исследования.

### **5. Промывка стекол в буфере.**

5.1. Стекла достают из раствора предподготовки и переносят в промывочный буфер на 2 мин.

5.2. Срезы достают из буфера, слегка подсушивают, удаляя излишки буфера (не до высыхания!),

5.3.1. при ручном способе выполнения ИГХ исследований — обводят гидрофобным карандашом вокруг среза (для предотвращения растекания реагентов).

5.3.2. при автоматизированном — стекла в кассетах сразу же помещают в автостейнер.

**6. Блок эндогенной пероксидазы.** Гистологические срезы помещаются в блокирующий раствор (Peroxidase-Blocking Solution, 3% водный раствор перекиси водорода) при комнатной температуре на 5 мин.

**7. Промывка срезов в буфере.** Срезы на 5 мин. помещают в промывочный буфер. Наиболее часто для этой цели используют TBS-буфер pH 7,0-7,6.

**8. Нанесение первичных антител.** На область расположения гистологического среза наносится 100 мкл раствора первичных антител к соответствующему рецептору. Антитела предварительно должны быть разведены до рабочей концентрации в соответствии с рекомендациями производителя. В нашей лаборатории для выявления рецепторов HER2 neu на мембранах клеток опухоли используются моноклональные мышиные антитела Monoclonal Mouse Anti – Human Ki-67 (Clone MIB-1). Инкубация первичных антител продолжается 30 мин. при комнатной температуре.

**9. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, однако не допуская его высыхания.

**10. Инкубация с применением визуализационной системы.** В соответствии с инструкцией по использованию на гистологический

срез наносится 100 мкл. визуализирующего реагента 2-step polimer conjugate. Необходимо проверить соответствие визуализационной системы и используемого антитела. В своей работе мы используем универсальную визуализационную систему, которая позволяет одновременное использование как мышиных так и кроличьих первичных антител, что полностью исключает возможность ошибки соответствия. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации — 30 мин.

**11. Промывка срезов в буфере.** Дважды промывают в промывочном TBS-буфере по 2 мин. Следует просушить гистологический срез после промывки, не допуская его высыхания.

**12. Инкубация с хромогеном.** Непосредственно перед постановкой реакции готовят рабочий раствор хромогена (из расчета 20 мкл (1 капля) на 1 мл субстрата) с учетом расхода 100 мкл на один гистологический срез. Чаще всего в ИГХ реакциях используется DAB Chromogen, связывающийся с комплексом используемой визуализационной системы с образованием нерастворимого осадка и обеспечивающий интенсивное коричневое окрашивание непосредственно у изучаемых структур. Инкубация осуществляется при комнатной температуре, время инкубации — 10 мин.

**13. Промывка среза** в дистиллированной воде, его ополаскивание.

**14. Подкраска ядер.** Для дифференцировки структур в срезе обычно докрашивают ядра клеток гематоксилином. Для этого используют основной краситель, чаще всего гематоксилин (Mayer's Hematoxylin, Lillie's Modification), который дает синее окрашивание без фиолетовых оттенков, что облегчает интерпретацию ИГХ реакции в последующем.

**15. Заключение ИГХ среза.** Гистологические срезы, окрашенные на Ki-67 дегидратируют (проводят по спиртам удаляя воду), просветляют (проводя через ксилолы) и заключают в бальзам или синтетическую среду. Срезы, закрытые покровными стеклами с применением синтетических сред можно оценивать уже через 30 мин., в дальнейшем они подлежат архивированию без ухудшения их качества в течение продолжительного времени.

**16. Оценка результата ИГХ окрашивания.** Осуществляется в соответствии с учетом следующих принципов:

Исследование Ki-67 должно проводиться в лабораториях с подтвержденной квалификацией.

Все образцы опухолей молочной железы подлежат исследованию на уровень экспрессии в опухолевой ткани Ki-67.

Экспрессия Ki-67 оценивается в инвазивном компоненте **на периферии** роста опухоли.

В каждом случае должно исследоваться не менее 500 опухолевых клеток в 3–5 полях зрения в зависимости от плотности опухоли, при увеличении  $\times 200$ . При наличии так называемых **«горячих точек»** пролиферации их дополнительно включают в обсчет (5 полей + одна «горячая точка»).

Оценивается только ядерное окрашивание, цитоплазматическое или мембранное окрашивание является артефактом и оценке не подлежит. Учитываются **все окрашенные ядра** независимо от интенсивности окраски.

Определяется индекс пролиферации Ki-67 — число положительно окрашенных ядер клеток от общего количества подсчитанных клеток, в процентах. Экспрессия Ki-67 оценивается как высокая ( $>20\%$ ) и низкая ( $<20\%$ ).

В последние годы все чаще проявляется стремление разработать общие принципы оценки степени экспрессии Ki-67 в ткани опухоли, т.к. различия в получаемых результатах в разных исследованиях колеблются от 15 до 40%. Более того, появляются автоматизированные комплексы для обсчета уровней пролиферации в гистологических срезах. Однако, несмотря на значительные успехи достигнутые в этой области, в работу рутинной патоморфологической лаборатории, по видимому они будут внедрены не в самом скором времени.

**Необходимые для ИГХ исследования Ki-67 контроли:**

**Необходимые для ИГХ исследования внешние контроли:**

***Положительный контроль антигена***

В качестве положительного контроля используются срезы, в которых заранее точно известно наличие исследуемого антигена — наиболее целесообразно использовать в виде контроля срезы с блока РМЖ с заранее известным уровнем экспрессии Ki-67.

***Отрицательный контроль антител***

Для постановки этого контроля следует использовать дополнительный гистологический срез с контрольного блока. Вместо первичных антител в соответствующих пунктах протоколов обработки на срезы необходимо нанести разбавитель антител. В таком контроле при окраске положительная реакция должна отсутствовать. Наличие положительной реакции свидетельствует о неспецифичности окраски за счет использования некачественных реактивов или грубых нарушений протокола ИГХ окрашивания.

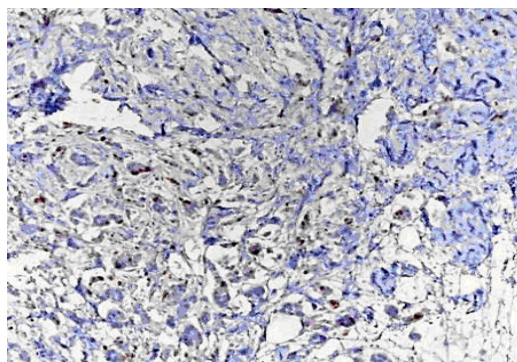
### **Внутренний контроль:**

Как правило, в опухоли присутствуют клетки, экспрессирующие Ki-67. Поэтому, если мы обнаруживаем ядерное окрашивание в клетках гистологического среза можно с уверенностью говорить, что реакция прошла.

### **Оценка результатов реакции:**

Уровень пролиферативной активности оценивали по ядерному индексу пролиферации клеток опухоли – Ki-67. По процентному отношению числа окрашенных ядер клеток карциномы к неокрашенным судили о пролиферативной активности исследуемой опухоли. Все случаи в соответствии со степенью пролиферации были распределены по трем группам [Бриллиант и др., 2012]. Первую группу составили случаи рака молочной железы с низким уровнем пролиферации, индекс ядерной пролиферации в которой менее 20% (Рис. 29), вторая группа содержала случаи со средней пролиферативной активностью опухоли (индекс Ki-67 от 20% до 30% включительно, рис. 30) и третья – случаи с высокой пролиферативной активностью опухоли (индекс Ki-67 более 30%, рис. 31).

При обработке данных 406 случаев карциномы молочной железы в соответствии с экспрессией белка Ki-67 на клетках карциномы были сформированы 3 группы. В первую группу были вошло 248 случаев (61%), в которых менее чем 20% клеток включительно экспрессировали Ki-67, во вторую группу вошли 82 случая (20%), в которых Ki-67 экспрессировали более чем 20%, но менее 30% клеток включительно. В третью группу вошло



*Рис. 29. Экспрессия Ki-67 в инвазивном раке молочной железы со степенью пролиферации 10% опухолевых клеток.  $\times 100$ .*

*Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера*

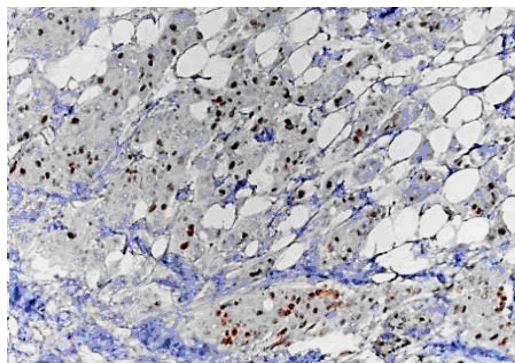


Рис. 30. Экспрессия KI-67 в инвазивном раке молочной железы со степенью пролиферации около 30% опухолевых клеток.  $\times 100$ .

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

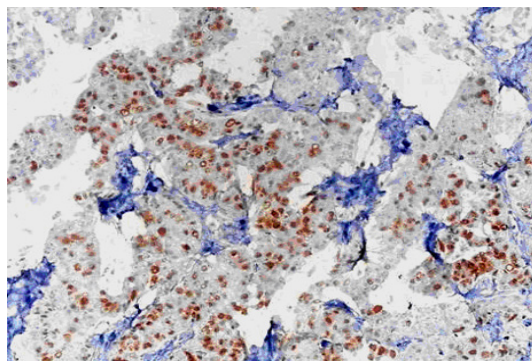


Рис. 31. Экспрессия KI-67 в инвазивном раке молочной железы со степенью пролиферации более 50% опухолевых клеток.  $\times 100$ .

Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер — гематоксилин Майера

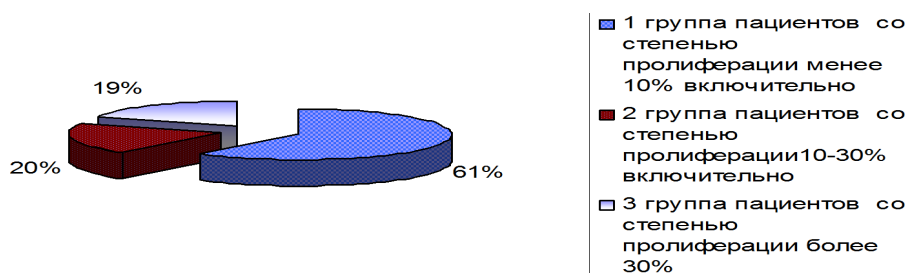


Рис. 32. Распределение пациентов с инвазивным раком молочной железы в соответствии с процентом клеток, экспрессирующих KI-67

76 случаев карцином (19%), где рецепторы KI-67 определялись на более чем 30% клеток. Распределение случаев с карциномой молочной железы в соответствии с процентом экспрессирующих KI-67 опухолевых клеток представлено на рис. 32.

Таким образом, большинство карцином молочной железы имеют низкий уровень пролиферации, то есть до 10% клеток экспрессируют рецепторы белка KI-67 [Бриллиант и др., 2011, Сазонов и др., 2011, 2013, 2015, 2017].

### 3.4. Определение подтипа рака молочной железы

На основании рекомендованной на 14th St. Gallen International Breast Cancer Congress (BCC, 2015) молекулярно-генетической классификации рака молочной железы сегодня выделяют 5 основных биологических подтипов различающихся по прогнозу и чувствительности к различным видам лекарственной терапии [Франк Г.А. и др., 2015, Esposito A., et al., 2014]. Учитывая значительно более ограниченное применение генетических методов исследования в патоморфологических лабораториях, разработана классификация, основанная на суррогатном иммуногистохимическом определении подтипов РМЖ, по сочетанию экспрессии рецепторов к эстрогену (ER), прогестерону (PR), HER-2 и Ki-67 (табл. 7).

*Таблица 7*

*Биологические подтипы инвазивного рака молочной железы*

Биологический подтип	ER	PR	HER-2	Ki-67
	Положительный если окрашено > 1% ядер опухолевых клеток	Положительный если окрашено > 1% ядер опухолевых клеток	Положительный если оценка 3+ ИГХ или 2+ и амплификация методом FISH > 2.0	Пороговое значение степени экспрессии, 14% ядер опухолевых клеток
<b>Luminal A</b>	ER и/или PR положительные		отрицательный	Низкое <14%
<b>Luminal B (HER/2 негативный)</b>	ER и/или PR положительные		отрицательный	Высокое >14%
<b>Luminal B (HER/2 позитивный)</b>	ER и/или PR положительные		положительный	Любое
<b>HER-2 гиперэкспрессированный</b>	отрицательные		положительный	Любое
<b>Тройной негативный</b>	отрицательные		отрицательный	Любое



Пролиферативную активность РМЖ в настоящее время принято учитывать только при разделении гормон-рецептор позитивных опухолей на Luminal A и Luminal B биологические подтипы (уровень экспрессии Ki-67 низкий и высокий соответственно). Причем пороговые значения степени экспрессии белка Ki-67 пересматривались за последние 10 лет несколько раз, и останавливались на значениях 10, 14, 20% опухолевых клеток. В настоящее время пограничным значением между низким и высоким уровнем пролиферации рекомендовано считать от 10 до 29 %. В остальных подтипах РМЖ считается, что уровень Ki-67 может быть любым и при их определении его значение можно не учитывать [Франк Г.А. и др., 2015].

Однако, проведенные в нашей лаборатории исследования показали, что имеются общие закономерности изменения уровней пролиферативной активности в ткани опухоли в зависимости от иммуно-подтипа опухоли.

Проведен анализ уровня пролиферативной активности РМЖ разных биологических подтипов на основании подсчета индекса пролиферации Ki-67. В каждой исследуемой группе определено минимальное и максимальное значение индекса Ki-67. Полученные данные представлены в табл. 8.

*Таблица 8*

*Диапазон значений индекса пролиферации Ki-67 в разных биологических подтипах инвазивного рака молочной железы*

Биологический подтип	Минимальное значение Ki-67	Максимальное значение Ki-67
Люминальный А	1%	14%
Люминальный В (HER-2 положительный)	15%	90%
Люминальный В (HER-2 отрицательный)	20%	90%
HER-2 гиперэкспрессированный	5%	90%
Тройной негативный подтип	20%	97%

Произведен подсчет средних значений индекса пролиферации Ki-67, стандартной ошибки среднего и доверительного интервала для среднего в каждой из изучаемых групп. Результаты статистического анализа представлены в табл. 9.



Таблица 9

Статистический анализ пролиферативной активности (Ki-67) в опухолевой ткани разных биологических подтипов инвазивного рака молочной железы

Биологический подтип	Доверительный интервал (95%)(-)	Доверительный интервал (95%)(+)	Среднее значение (М)	Стандартная ошибка среднего (m)
Люминальный А	7%	9%	8,4%	0,2%
Люминальный В (HER-2 положительный)	23%	33%	28,8%	2,5%
Люминальный В (HER-2 отрицательный)	30%	34%	32,3%	1,0%
HER-2 гиперэкспрессированный	34%	43%	39,0%	2,2%
Тройной негативный подтип	50%	58%	54,6%	2,1%

Среднее значение индекса Ki-67 разных биологических подтипов РМЖ представлено на рис. 33.

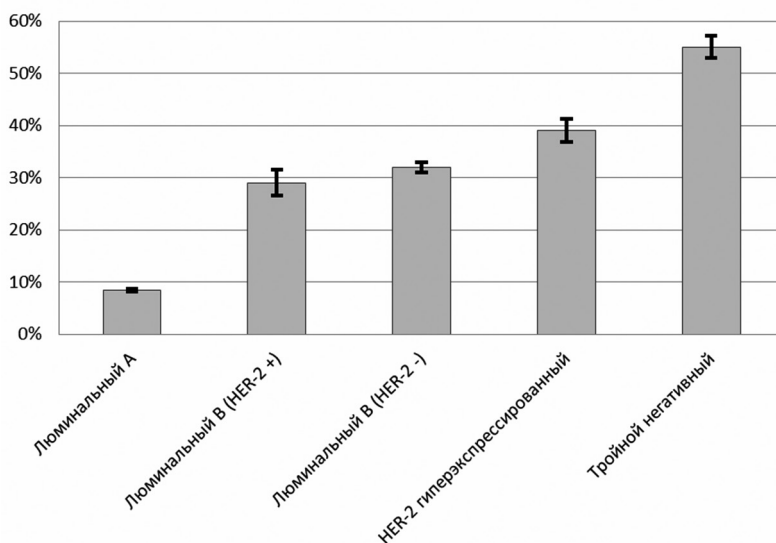


Рисунок 33. Среднее значение индекса пролиферативной активности по Ki-67 в разных биологических подтипах рака молочной железы

Проведение статистического исследования позволило установить некоторые закономерности состояния пролиферативных процессов в опухолевой ткани инвазивного рака молочной железы в зависимости от определяемого молекулярно-биологического подтипа. Средний уровень индекса пролиферации Ki-67 для группы опухолей Люминального А подтипа установлен в  $8,4 \pm 0,2\%$ , при этом для генеральной совокупности случаев Люминального А подтипа среднее значение Ki-67 с доверительной вероятностью 95% находится в диапазоне ДИ=7-9%. Средний уровень индекса пролиферации Ki-67 для группы опухолей Люминального В (HER-2 положительный) подтипа составил  $28,8 \pm 2,5\%$ , при этом для генеральной совокупности случаев Люминального В (HER-2 положительный) подтипа среднее значение Ki-67 с доверительной вероятностью 95% находится в диапазоне ДИ=23-33%. Средний уровень индекса пролиферации Ki-67 для группы опухолей Люминального В (HER-2 отрицательный) подтипа равняется  $32,3 \pm 1,0\%$ , при этом для генеральной совокупности случаев Люминального В (HER-2 отрицательный) подтипа среднее значение Ki-67 с доверительной вероятностью 95% находится в диапазоне ДИ=30-34%. Средний уровень индекса пролиферации Ki-67 для группы опухолей HER-2 гиперэкспрессированного подтипа определен как  $39,0 \pm 2,2\%$ , при этом для генеральной совокупности случаев HER-2 гиперэкспрессированного подтипа среднее значение Ki-67 с доверительной вероятностью 95% находится в диапазоне ДИ=34-43%. Средний уровень индекса пролиферации Ki-67 для группы опухолей Тройного негативного подтипа составляет  $54,6 \pm 2,1\%$ , при этом для генеральной совокупности случаев Тройного негативного подтипа среднее значение Ki-67 с доверительной вероятностью 95% находится в диапазоне ДИ=50-58%.

Выявлены достоверные различия в уровне пролиферации между всеми исследуемыми группами опухолей ( $p < 0,05$ ), за исключением групп опухолей Люминального В (HER-2 отрицательный) и Люминального В (HER-2 положительный) биологических подтипов ( $p > 0,05$ ). Закономерности изменения уровня индекса пролиферации Ki-67 в зависимости от биологического подтипа опухоли представлены на рис. 33. Обнаружено, что наименьший уровень пролиферации характерен для Люминального А подтипа карциномы молочной железы (среднее значение —  $8,4\%$ ), наибольший уровень пролиферации в ткани опухолях, относящихся к Тройному негативному подтипу, при этом средний уровень индекса пролиферации в

данной группе достигает 54,6%. Уровень пролиферации в группе опухолей Люминального А подтипа ниже на 20%, чем в аналогичной группе Люминального В (HER-2 положительный) подтипа, на 24%, чем в группе опухолей Люминального В (HER-2 отрицательный) подтипа, на 31%, чем в группе случаев HER-2 гиперэкспрессированного подтипа и на 46%, чем в аналогичной группе Тройного негативного подтипа ( $p<0,05$ ). Не выявлено достоверных различий между уровнями экспрессии Ki-67 в группах Люминального В (HER-2 позитивный) и Люминального В (HER-2 негативный) подтипов ( $p>0,05$ ). Уровень пролиферации в случаях, относящихся к Люминальному В (HER-2 позитивный) подтипу достоверно ниже, чем в аналогичной группах HER-2 гиперэкспрессированного и Тройного негативного подтипов на 10 и 26% соответственно ( $p<0,05$ ). Уровень экспрессии случаев Люминального В (HER-2 негативный) подтипа так же достоверно ниже, чем в группах опухолей HER-2 гиперэкспрессированного и Тройного негативного подтипов на 7 и 22% соответственно ( $p<0,05$ ). Уровень экспрессии индекса пролиферации в группе случаев HER-2 гиперэкспрессированного подтипа - достоверно ниже аналогичного показателя в группе случаев Тройного негативного подтипа на 16% ( $p<0,05$ ).

Пролиферация опухолевых клеток рака молочной железы в первую очередь регулируется через внутриклеточный сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK, реализация которого связана одновременно как с тирозинкиназными рецепторами (HER-2), так и с активностью эстрогенового сигнального пути и наличием Estrogen receptor [Bilous M., et al., 2003]. Эти взаимодействия внутри указанного сигнального пути при определении экспрессии рецепторов при изменении степени дифференцировки опухолевых клеток, по-видимому, играют основную роль в состоянии процессов пролиферации в опухолевой ткани рака молочной железы любых биологических подтипов. Исчезновение обозначенных выше рецепторов на опухолевых клетках приводит к уходу последних из под контролирующего влияния регуляторных факторов и приводит к бесконтрольному вступлению клеток опухоли в пролиферацию, в результате чего большинство опухолевых клеток выходят в митотический цикл и находятся в разных его периодах, что сопровождается методической возможностью выявления ИГХ методом в их ядрах белка Ki-67.

Количество клеток, экспрессирующих в ядрах Ki-67 достоверно увеличивается при опухолевой трансформации по сравнению с уровнем пролиферации в обычном люминальном эпителии молоч-

ной железы. Уровень пролиферативных процессов, экспрессия рецепторов в люминальном эпителии так же циклически изменяется во время овариально-менструального цикла у женщины в связи с колебаниями в ее крови концентрации женских половых гормонов.

Уровень пролиферации в опухолевой ткани при РМЖ так же в первую очередь связан с особенностями рецепторного аппарата клеток. Индекс пролиферации Ki-67 в ткани гормон-рецептор-позитивного РМЖ является относительно низким (менее 10%) для Люминального А подтипа и достоверно более высоким для Люминального В, что отражено в общепринятой на сегодняшний день молекулярно-генетической классификации. Необходимо уточнить, что низкий уровень пролиферации в группе РМЖ, отнесенных с помощью ИГХ метода к Люминальному А подтипу формируется путем искусственной селекции в эту группу случаев с пролиферативным индексом ниже 14%. Случаи гормон-рецептор-позитивного рака, с пролиферативным индексом более 14% соответственно относят к Люминальному В подтипу. В результате такой избирательной селекции формируется две группы РМЖ, достоверно отличающихся по среднему уровню пролиферации в ткани опухоли (уровни пролиферации  $8,4 \pm 0,2\%$  и  $28,8 \pm 2,5\%$  соответственно).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о достоверно более высоком уровне пролиферативных процессов в опухолевой ткани гормон-рецептор-негативных раков молочной железы по сравнению с гормон-рецептор-позитивными подтипами рака. Наиболее высокий уровень экспрессии Ki-67 обнаружен в случаях, относящихся к Тройному негативному подтипу рака молочной железы (средний уровень экспрессии составляет  $54,6 \pm 2,1\%$ ).

Обнаруженные достоверные различия уровней экспрессии Ki-67, выявленные для всех подтипов РМЖ, позволяют рекомендовать учет их как дополнительного диагностического критерия на соответствие ИГХ показателей внутри каждого подтипа.

## **Глава 4. Организация работы системы пересмотра материала РМЖ (референс)**

### **4.1. Основные принципы проведения референсных исследований**

Первые полученные результаты контроля качества морфологической диагностики опухолей, проведенные в Российской Федерации, по данным проф. Франка Г.А. и др., 2011, говорят о наличии неточностей при формулировке морфологических заключений в 5-71% всех случаев, а также наличие существенных дефектов в методике проведения иммуно-гистохимических исследований. Неточности в диагностике рака молочной железы (РМЖ) сопровождаются последующими ошибками в назначении химиотерапии, определении прогноза заболевания, в конечном итоге – существенными материальными потерями и ухудшением качества жизни пациентов.

Доступность и качество является сегодня одним из основных принципов оказания медицинской помощи (Федеральный закон от 23 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»). Качество оказания медицинской помощи согласно статье 2 этого же закона определено как совокупность характеристик, отражающих своевременность оказания медицинской помощи, правильность выбора методов диагностики и лечения, степень достижения запланированного результата.

Выделение нескольких биологических подтипов рака молочной железы (St.Gallen, 2013) при генетическом тестировании или «суррогатном» иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании позволяет онкомамологу оценивать прогноз заболевания и определять тактику лечения. При этом, сегодня, по сути определена минимальная панель моноклональных антител, необходимых для иммуногистохимического исследования: определение рецепторов Estrogen, Progesterone, HER2 neu и маркера клеточной пролиферации по определению экспрессии в ядрах опухолевых клеток - Ki67. В связи с этим, а так же с учетом стоимости проводимых диагностики и лечения пациентов раком молочной железы (РМЖ), повышаются требования к качеству проводимых иммуногистохимических исследований, их стандартизации и воспроизводимости в гистологической лаборатории. Появляется необходимость создания системы комплекса мероприятий, направленных на обеспечение качества проводимых исследований.

Первая большая группа мероприятий связана с разработкой и закреплением нормативными документами требований к осуществлению деятельности в патоморфологических лабораториях (лабораториях первого просмотра материала). Сюда относятся: использование стандартизованных процедур обработки материала, использование стандартизованных методов ИГХ исследования, определение минимально достаточного и необходимого перечня используемых отрицательных и положительных контролей, единых стандартизованных критериев оценки результатов проведенных исследований, заполнение универсальных форм протоколов исследования, обучение персонала лабораторий.

Вторая группа мероприятий связана с созданием системы внешнего контроля качества проводимых иммуногистохимических исследований. В первую очередь к ним относится разработка нормативных документов, регламентирующих организацию и последующую работу региональных референс-лабораторий (лабораторий второго просмотра, пересмотра материала), центральной референс-лаборатории, одной из функций, которых является осуществление контроля за качеством проводимых исследований, источники финансирования их работы. Конкордантность проводимых иммуногистохимических исследований в лаборатории первого просмотра и референс-лаборатории должна составлять не менее 95% с позитивными и негативными случаями, для молекулярно-биологических исследований методом ISH не менее 90%.

Третья группа мероприятий должна быть направлена на исправление несоответствий Стандарта медицинской помощи больным со злокачественными новообразованиями молочной железы 0,I,II,IIIА (Tis,T1-3N0-2M0) стадии (хирургическое лечение) современным требованиям иммуногистохимической диагностики РМЖ, приведение их к минимально необходимому уровню диагностики.

В 2005 г. экспертная группа BHGI (Breast Health Global Initiative) по проблемам рака молочной железы разработала рекомендации по диагностике рака молочной железы (РМЖ) в странах с «ограниченными финансовыми ресурсами системы здравоохранения» [Anderson B.O., et al., 2006, Vargas H.I., et al., 2004]. Предложенная экспертами схема предоставляет последовательную, методичную основу для совершенствования возможностей диагностики рака молочной железы, в том числе патоморфологических исследований. Эксперты организации пришли к заключению, что перед началом лечения рака молочной железы обязательна патоморфологическая

верификация диагноза, основанная на микроскопическом исследовании образцов ткани. Для улучшения качества диагностики при патологии молочной железы было намечено несколько приоритетных направлений, среди них, как основные можно выделить:

- 1) организация системы обучения врачей патологоанатомов;
- 2) внедрение новых высокотехнологичных (в том числе молекулярно-биологических) методов патоморфологической диагностики в специализированных лечебно-профилактических учреждениях;
- 3) организация системы референс-лабораторий в патологоанатомической службе и внедрение контроля качества проводимых исследований.

В мировой практике первая система внешнего контроля качества UKNEQAS была создана в Великобритании в 1985 г., позднее принцип обязательного пересмотра материала опухолей разными патологами и лабораториями стал внедряться и в других странах [Франк Г.А. и др, 2011, Сазонов С.В., 2010]. Внедрение системы референса вплотную приближает Российские патоморфологические лаборатории, участвующие в ней, к созданию в их работе условий, соответствующих требованиям ISO 15189:2003, ГОСТР ИСО-2006 «Медицинские лаборатории. Специальные требования к качеству и компетентности».

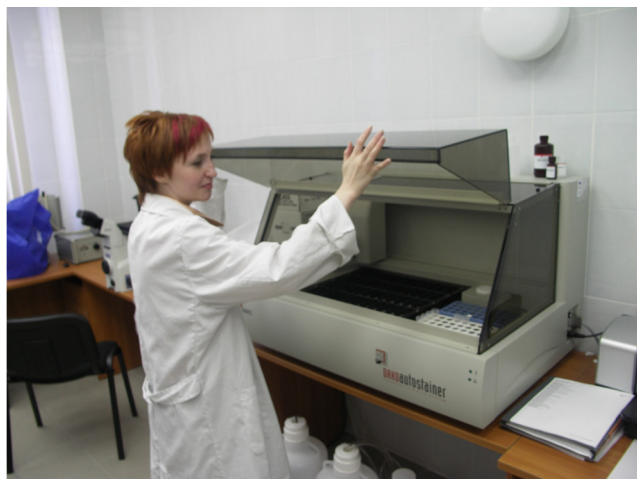
Одним из возможных путей решения этой проблемы является внедрение в патологической анатомии системы обеспечения качества проводимых молекулярно-биологических исследований, основанной на создании референсных лабораторий в субъектах Российской Федерации [Франк Г.А. и др, 2011].

Региональная референсная лаборатория (лаборатория второго просмотра) создается на базе молекулярно-генетической лаборатории патолого-анатомического отделения учреждения здравоохранения, научно-исследовательского института или кафедры патологической анатомии, обладающей в своем арсенале двумя специальными методами исследования [Perez E.A., et al., 2002]: иммуногистохимическим (метод позволяет определять уровень экспрессии рецептора в ядрах или на поверхности мембран опухолевых клеток) (рис. 34) и *in situ* hybridization (ISH- молекулярно-генетический метод, позволяющий определять наличие амплификации мутантного гена в ядре опухолевой клетки) (рис. 35).

Иммуногистохимический (ИГХ) метод нашел широкое применение в связи с тем, что повседневно используется для оценки экс-



прессии многих белков и рецепторов, и, может быть выполнен на срезах парафиновых блоков ткани, фиксированной формалином. При несомненных достоинствах ИГХ метода: легкой воспроизводимости и относительной дешевизне, он имеет и некоторые недостатки. Так, возможны ложнопозитивные результаты, обусловленные техническим несовершенством метода, кроме того, например, гиперэкспрессия Her2 при РМЖ может быть несвязанной с амплификацией гена. Возможны и ложноотрицательные результаты теста. В некоторых случаях, после заливки в парафин, ткани опухоли, могут терять рецепторы на поверхности мембраны и утрачивать способность давать специфическое окрашивание при проведении ИГХ-исследования. При должной стандартизации методик данные ИГХ-исследования как при Her2-негативном (категории 0 и 1+), так и Her2-позитивном РМЖ (категория 3+) подтверждаются результатами ISH. В лаборатории LabCorp соответствие результатов двух методов отмечали у 89% пациентов. У 4% пациентов Her2-позитивность по результатам ИГХ-исследования (категория 3+) не подтвердилась результатами ISH [Zerbo R.J., et al., 2003].



*Рис. 34. Проведение ИГХ исследования с использованием автостейнера DAKO.*

Некоторую проблему составляют случаи РМЖ, относящиеся к категории сомнительных (неоднозначных) по данным ИГХ-исследования. В 15% случаев десять и более процентов клеток инвазивного рака демонстрируют полное, однако неравномерное окра-

шивание. Очень редко отмечают вариант интенсивного окрашивания всей мембраны в 10 и менее процентах опухолевых клеток. Эти случаи относят к категории 2+, а результат расценивают как неоднозначный. Проведенные крупные многоцентровые исследования продемонстрировали, что только в части случаев (от 12 до 24%), относящихся к категории 2+, при ISH выявляется амплификация гена и они являются в действительности Her2-позитивными, что делает необходимым проведение исследования РМЖ в два этапа [Cobleigh M.A., et al., 1997].



*Рис. 35 Проведение молекулярно-биологических исследований методом ISH на автоматизированной платформе Ventana.*

С 2006 г. в Российской Федерации под эгидой Российского общества патологоанатомов (РОП) для обеспечения качества проводимых молекулярно-биологических исследований при диагностике РМЖ было запущено первое мультицентровое исследование в соответствии с Протоколом “HER2 Screening Program ML 19870» [Франк Г.А., и др. 2012]. ИГХ исследования проводились в 89 лабораториях, включая 6 референсных центров по всей стране. К 2014 г. в Российской Федерации по Программе было выполнено более 250 тыс. иммуногистохимических исследований. Если молекулярно-биологические исследования в 2007 г. выполнялись в двух лабораториях (за год выполнено 335 исследований), то в 2011 г. уже в 14 лабораториях выполнено 3862 исследования [Франк Г.А. и др., 2012]. С 2008 г. к указанному проекту подключилась лаборатория молекулярно-биологических исследований патологоанатомического отделения Института медицинских клеточных тех-

нологий Министерства здравоохранения Свердловской области (г. Екатеринбург) в качестве референсной лаборатории Уральского Федерального округа (УрФО). В проект вошли 11 иммуногистохимических лабораторий первого просмотра из учреждений здравоохранения УрФО. В 2016 г. в иммуногистохимических лабораториях учреждений здравоохранения УрФО проведено 5.642 ИГХ и 632 ISH исследований.

## 4.2. Материалы и методы

Учитывая, что молекулярно-генетические исследования в проводятся не во всех патолого-анатомических отделениях учреждений здравоохранения УрФО, референс (пересмотр) тестирования HER2 РМЖ осуществлялся в соответствии со следующим алгоритмом:

1) на первом этапе в лаборатории первого просмотра проводился скрининг с использованием ИГХ-метода: ИГХ 3+ случаи рассматривали как позитивные, ИГХ 0/1+ как негативные;

2) в отношении Her2/неу 2+ случаев проводилось повторное тестирование в региональной референс-лаборатории с использованием метода ИГХ, при подтверждении результата — с использованием метода ISH, позволяющего оценить количество копий гена Her2/неу и исключить наличие полисомии по хромосоме 17.

Только при наличии заключения из референс-лаборатории решался вопрос о назначении пациентке соответствующей химиотерапии [Slamon D.J., et al., 2001, Vogel C.L., et al., 2002] (Рис. 36).

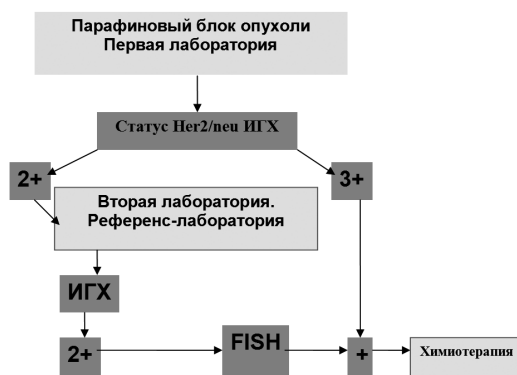


Рис. 36. Схема проведения молекулярно-биологических исследований рака молочной железы в лаборатории первого просмотра и референсной лаборатории второго просмотра

Метод выявления наличия амплификации гена — гибридизация *in situ* (ISH) — является золотым стандартом в диагностике Her2-позитивных РМЖ. Метод позволяет оценить количество копий гена в клетке, а более совершенные его варианты — флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) или SISH — определить количество хромосом 17. Считается, что результат теста является положительным, если соотношение среднего количества копий гена Her2 и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке превышает 2,2 [Ma Y., et al., 2005, Wolff A.C., et al., 2007].

Приемлемой для стандартизированной ИГХ лаборатории частота ложнонегативных результатов принята за 5%. Лабораториям рекомендуется проводить параллельную оценку статуса Her2/neu с использованием ИГХ-метода и ISH до тех пор, пока у менее 5% пациентов, относящихся по данным ИГХ-исследования к категории 0/1+, результаты окажутся позитивными при проведении ISH-теста [Reddy J.C., 2006].

### **4.3. Схема проведения молекулярно-биологических исследований рака молочной железы**

В работе по проведению референсных исследований по обеспечению качества молекулярно-генетических исследований РМЖ в 2008–2016 гг. принимало участие 11 патолого-анатомических отделений из учреждений здравоохранения УрФО (рис.37):

1) референс-лаборатория УрФО — молекулярно-генетическая лаборатория патолого-анатомического отделения ГАУЗ СО ИМКТ, г. Екатеринбург, Свердловская область;

2) ГБУЗ СОПАБ, лаборатория иммуногистохимии, г. Екатеринбург, Свердловская область;

3) ГБУЗ ОДКБ, иммуногистохимическая лаборатория Областного детского онко-гематологического центра, г. Екатеринбург, Свердловская область;

4) ГБУЗ СО ООД №2, патологоанатомическое отделение, г. Нижний Тагил, Свердловская область;

5) ГБУЗ СО ООД №3, патологоанатомическое отделение, г. Каменск-Уральский, Свердловская область;

6) ГБУЗ ЧОКОД, патологоанатомическое отделение, г. Челябинск, Челябинская область;

7) ГБУЗ ЧОПАБ, лаборатория иммуногистохимии, г. Челябинск, Челябинская область;

8) ГБУЗ ТООД, патологоанатомическое отделение, г. Тюмень,

Тюменская область;

9) ГБУЗ СОКБ, патологоанатомическое отделение, г. Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ;

10) ГБУЗ НОД, патологоанатомическое отделение, г. Нижневартовск, Ханты-Мансийский автономный округ;

11) ГБУЗ ХМОКБ, патологоанатомическое отделение, г. Ханты-Мансийск, Ханты-Мансийский автономный округ.

### Схема пересмотра материала (референс) больных с раком молочной железы

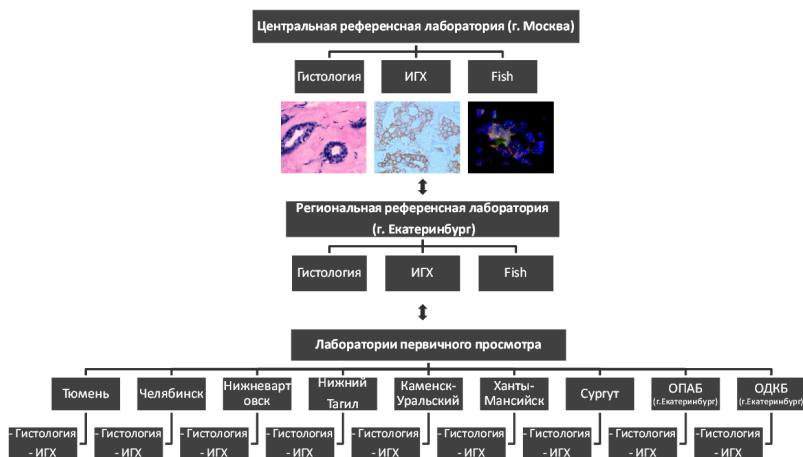


Рис. 37. Схема проведения референсных исследований рака молочной железы в УрФО.

Для работы в региональную референсную лабораторию второго просмотра поступали готовые парафиновые блоки и стекла с проведенной в лаборатории первого просмотра иммуногистохимической реакцией и результатами оценки исследования. Референс проводился для каждого случая с неоднозначным уровнем экспрессии HER2-2+. Для лабораторий первого просмотра с объемом ИГХ исследований РМЖ более 250 случаев в год дополнительно на референсное исследование отправлялся каждый 20 случай независимо от его результата. Для лабораторий с объемом ИГХ исследований РМЖ менее 250 случаев в год — каждый 10 случай. Если лаборатория только начала принимать участие в программе референса, то отправлялось 100% всего протестированного материала до достижения совпадения результатов в 95% всех случаев [Cobleigh M.A., et al, 1997,

Fretschy J.M., 2008, Reddy J.C., 2006, Vyberg M., et al., 2005].

Референсные иммуногистохимические исследования уровней экспрессии рецепторов Estrogen, Progesterone, Ki67 и HER2 осуществлялись с использованием автостейнера “DAKO” (Дания). Предварительно гистологические срезы обрабатывались в блоке предподготовки материала “LINK DAKO Cytomation» (Дания).

Молекулярно-биологические исследования по выявлению наличия амплификации гена HER2 проводились на автостейнере экспертного класса Ventana autostainer Benchmark GX (universal staining system, США) с использованием INFORM HER2 Dual ISH DNA (Ventana) в модификации SISH dual color.

Оценку реакций осуществляли на световом микроскопе “Zeiss Imager M” (Германия).

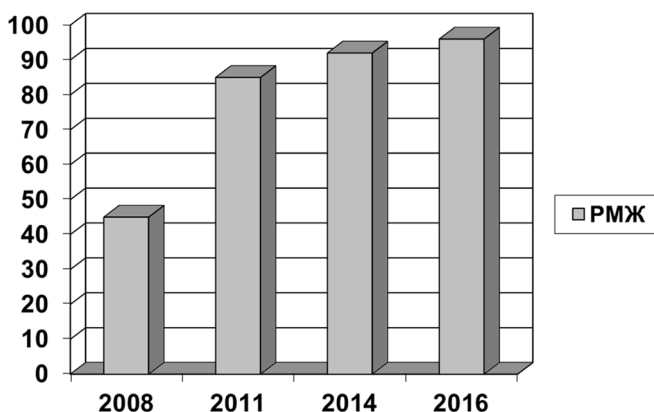
Референсные исследования препаратов на ИГХ HER2 и амплификацию гена HER2 из референсной лаборатории УрФО проводились на базе Центральной референсной лаборатории — патологоанатомического отделения ФГУ Московский научно-исследовательский институт им. П.А. Герцена, г. Москва, с 2012 г. — в молекулярно-генетической лаборатории кафедры патологической анатомии РАПО, г. Москва, (зав. отделением, зав. кафедрой, руководитель проекта, академик РАН, главный патологоанатом РФ, профессор Г.А. Франк).

По результатам исследования формировались базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Статистические исследования выполнены с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете «Statistica 6.0.».

#### **4.4. Результаты внедрения системы референсных исследований**

##### **Динамика исследований пациенток с РМЖ по программе HER2 тестирования**

Всего лабораториями, включенными в систему проведения референса за годы реализации программы проведены ИГХ исследования 37 800 пациенткам с РМЖ. Если в 2008 г. проведено всего 2508 иммуногистохимических исследований пациенткам с раком молочной железы, что составило 58% от всех заболевших, то в 2016 г. проведено уже 5642 иммуногистохимических исследования, что составило 96% от всех вновь выявленных пациенток (рис. 38).



*Рис. 38. Процент охвата ИГХ исследованиями пациенток с РМЖ*

Необходимо отметить, что охват пациенток с раком молочной железы HER2 тестированием в 2008 г. осуществлялся крайне неравномерно и колебался от 28 до 95 % от всех случаев в разных учреждениях УрФО. Значительно колебались и значения процента положительных результатов Her2/neu тестирования. Так, средний % протестированных и расцененных как 2+ находился в пределах от 4,0 до 32,2 в разных лабораториях. Не меньшая разница отмечалась и при анализе числа случаев с уровнем экспрессии 3+, где разброс средних результатов тестирования составлял от 4,2 до 27,2%. Это при том, что средние уровни изучаемых показателей по данным центральной референс-лаборатории должны составлять около 20% для 3+ и 10% для 2+ случаев. Этот факт говорил об отсутствии при вступлении в проект в иммуногистохимических лабораториях системы стандартизации исследований и единых подходов к оценке проводимых исследований. На результаты исследования влияло множество субъективных факторов или параметров, которые можно разделить на преаналитические, аналитические и постаналитические. К преаналитическим факторам, влияющим на результаты ИГХ исследования можно отнести особенности фиксации, проводки и заливки материала, качество получаемых в лаборатории гистологических срезов. Под аналитическими параметрами понимают особенности протокола ИГХ исследований, применяемого в конкретной лаборатории, особенности предподготовки срезов для исследования, использование реагентов для иммуногистохимических исследований от разных производителей, разный методический уровень проведения исследований (автоматизированный или ручной варианты, время ин-



кубации антител, используемые растворы с разными pH и т.д.). На постаналитическом этапе наибольшее значение имеет разный уровень квалификации и опыт персонала [Vyberg M., et al., 2005].

На референс для проведения иммуногистохимических исследований уровней экспрессии и проведения дополнительно молекулярно-генетических исследований для выявления амплификации гена в случаях с уровнем экспрессии Her2/neu 2+ методом ISH поступило 315 блоков пациенток с РМЖ, что составило 12,6% от всех проведенных исследований в 2008 г. (Табл. №10). Процент направленных на референс случаев значительно колебался в разных лабораториях составляя от 2,7% до 100,0% всех случаев.

*Таблица №10*

*Результаты иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований случаев, поступивших на референс*

Лаборатории проекта	Количество случаев ИГХ направленных на референсное исследование (0,1+,2+3+)		% случаев, направленных на референсное исследование		Количество ISH исследований направленных на референсное исследование		% совпадений HER2 статуса	
	2008 г.	2016 г.	2008 г.	2016 г.	2008 г.	2016 г.	2008 г.	2016 г.
Лаборатория 1	25	143**	2,7	7,0	15	110	95	96
Лаборатория 2*	4	71	6,5	4,0	0	0	72	100
Лаборатория 3*	94	25	11,6	7,0	0	0	64	96
Лаборатория 4*	40	124	32,0	10,0	0	0	60	93
Лаборатория 5*	57	14	100,0	1,0	0	0	86	93
Лаборатория 6*	20	12	25,7	2,0	0	14	71	90
Лаборатория 7*	25	39	11,0	11,0	0	0	77	85
Лаборатория 8*	26	1	11,5	<1	0	0	85	-
Лаборатория 9*	10	1	16,6	<1	0	0	80	100
Лаборатория 10*	25	30	21,0	15,0	0	0	64	83
Лаборатория 11*	0	36	-	9,0	-	0	57	80
ВСЕГО	315	521	12,6	7,5	15	124	73,7	91,6

Примечание: \* — условный номер лаборатории, не совпадающий с порядковым номером в списке; \*\* — референс-исследования, проведенные в Центральной референс

Все имеющиеся случаи (100% пациенток) были направлены на пересмотр лабораторией, присоединившейся к референсным исследованиям в 2010–2012 гг. и по договоренности в первый год участия в референс-системе направляющей каждый случай РМЖ, исследованный ИГХ. В то же время, анализ данных по % направленных на референс случаев позволяет говорить о нарушении структуры направляемых на пересмотр случаев (все 2+ и каждый 10 случай) почти каждой лабораторией. По проценту совпадения оценки результатов ИГХ исследований при их пересмотре в 2008 г. среди иммуногистохимических лабораторий первого просмотра материала имелись значительные различия. Процент совпадения оценки колебался от 57 до 100% от всех прошедших референс случаев. Лучшие результаты показывали лаборатории с большими объемами ИГХ исследований и оснащенные автоматизированными комплексами для проведения исследований.

При проведении референсных исследований в Центральной референсной лаборатории случаев с определением HER2-тестирования из региональной референсной лаборатории второго просмотра УрФО установлено, что в 95% случаев результат уровней экспрессии при проведении референсных исследований был подтвержден, что позволяет говорить о допустимой конкордантности получаемых данных и достаточной эффективности ее работы как референс лаборатории второго пересмотра.

Проведенные молекулярно-генетические исследования материала пациентов с уровнем экспрессии Her2 – 2+ при проведении среди таких пациентов методом ISH в 27% случаев позволили обнаружить увеличение среднего количества копий (амплификации) гена Her2 хромосомы 17 в ядрах опухолевых клеток, что привело к увеличению числа пациентов с положительным HER2 статусом.

При сравнении динамики основных показателей, отражающих работу референсной лаборатории второго просмотра, можно установить некоторые закономерности и подвести промежуточные итоги реализации проекта РОП по HER2-тестированию РМЖ и организации референсных исследований на территории УрФО с 2008 по 2016 гг. Результаты работы за промежуточные годы (с 2009 по 2015 гг.) представлены в ранее опубликованных статьях, поэтому фактический материал промежуточных лет повторно в данной статье не приводится [Сазонов С.В. и др., 2009, 2010, 2011, Леонтьев С.Л. и др., 2014, Сазонова С.В. и др., 2015, 2016, 2017]. С учетом всех имеющихся материалов по проекту можно сделать следующие **выводы**:

**1. Полнота охвата исследованиями пациенток с РМЖ.** Количество пациенток с РМЖ за время реализации проекта увеличилось почти в 2 раза (с 58 до 96%). В настоящее время по сути все пациентки охвачены молекулярно-генетическими исследованиями. Уменьшилась неравномерность обследования в зависимости от учреждения здравоохранения, в котором осуществлялись диагностика и лечение заболевания.

**2. Средний процент HER2 2+ случаев РМЖ.** До начала проекта показатель находился в пределах от 8,0 до 29,5% в разных лечебных учреждениях, при средних мировых значениях около 10%. В 2016 г. процент HER2, 2 + случаев находился в пределах от 10 до 15%.

**3. Средний процент случаев РМЖ, расцененных как HER2 3+.** В 2008 г. составлял в лабораториях от 10,2 до 34,5% от всех случаев. В 2016 г. процент HER2, 3+ случаев находился в пределах от 10 до 18%, при средних мировых значениях показателя около 15%).

**4. Средний процент протестированных HER2 позитивных случаев РМЖ в региональной референсной лаборатории второго просмотра.** В 2008 г. количество направленных на референс составило 12,6% от всех первично диагностированных случаев РМЖ. Снижение процента к 2016 г. связано как с большим соблюдением требований к отбору случаев РМЖ на референсные исследования, так и увеличением числа пациенток, вовлеченных в проект.

**5. Средний процент пациенток с РМЖ, направленных на референс.** Если в 2008 г. количество направленных на референсные исследования колебалось в границах от 2,7 до 100%, то в 2015 г. в референсную лабораторию поступило и исследовано от 1 до 15% пациенток с раком молочной железы. Анализ данных по проценту направленных на референс позволяет говорить о нарушении структуры направляемых на пересмотр случаев (все 2+ и каждый 10 или 20 случай) почти каждой лабораторией.

**6. Процент совпадения оценки результатов ИГХ исследований после референсных исследований.** Важным является показатель, отражающий эффективность работы референсной системы - процент совпадения оценки результатов ИГХ исследований первичной лаборатории при их пересмотре в референсной лаборатории. И по этому показателю имеются значительные различия среди лабораторий (Табл. 1). Если процент совпадения оценки в 2008 г. колебался от 57 до 95% от всех случаев, то в 2016 г. — от 80 до 100%. Необходимо отметить тот факт, что лучшие результаты, как правило, показывают лаборатории с большими объемами ИГХ иссле-

дований и оснащенные автостейнерами. Последний момент, наряду с накоплением опыта лабораторий в проведении исследований, играл роль в улучшении результатов молекулярно-генетической диагностики РМЖ. При проведении референса в Центральной референсной лаборатории случаев с определением HER2 neu тестирования из референсной лаборатории второго просмотра УрФО установлено, что в 2008 г. и 2016 г. соответственно в 95% и 96% случаев результат исследования был подтвержден, что позволяет говорить об достаточной конкордантности (совпадения) этих лабораторий [Reddy J.C., 2006].

## **7. Налажена методическая работа референс лабораторий УрФО.**

7.1. В юридическом сопровождении проведения референсных исследований в рамках Проекта РОП решены вопросы с обеспечением прав пациентов РМЖ, проработана процедура оформления информированного согласия на проведения референс-исследований [Солоницына Л.А. и др. 2012, 2013, 2015];

7.2. разработаны вопросы логистики доставки материала пациентов для проведения исследований в региональную референсную лабораторию второго просмотра и Центральную референсную лабораторию [Франк Г.А. и др. 2014, Леонтьев С.Л., Сазонов С.В., 2012, Сазонов С.В. и др., 2015].

7.3. В 2015 г. заведующие референсных лабораторий приняли активное участие в обсуждении, разработке и подготовке к изданию «Клинических рекомендаций Российского общества онкомаммологов по диагностике и лечению рака молочной железы», вошли в состав большого авторского коллектива, наряду с ведущими экспертами других специальностей [Семиглазов В.Ф. и др., 2015, Семиглазов В.Ф. и др., 2016, Пожарисский К.М. и др., 2016].

7.4. Итоги работы референсных лабораторий, обсуждение новых подходов в диагностике РМЖ происходило на проводимых РОП ежегодных Форумах экспертов по диагностике и лечению рака молочной железы с привлечением иностранных и отечественных ведущих специалистов: как патологов, так и клиницистов, в том числе и с использованием интерактивных технологий обучения.

7.5. Ежегодные отчеты референс-лабораторий о проделанной работе, публикация отчетов в научно-практических журналах [Сазонов С.В. и др., 2009, 2010, 2011, 2013, 2014, 2015, Леонтьев С.Л., Сазонов С.В., 2012].

## **8. Сертификация работы региональных референсных ла-**

**бораторий первого и второго просмотра материала.** С 2012 г. референс-лаборатории проходят сертификацию через Европейскую систему контроля качества – NordIQC (Nordic Immunohistochemical Quality Control) по основным методам исследования [Vyberg M., et al., 2005]. В 2015 г. Форум экспертов РОП рекомендовал всем лабораториям, осуществляющим ИГХ диагностику РМЖ пройти процесс добровольной сертификации иммуногистохимического метода исследований с получением Разрешения Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения на проведение данного вида исследований [Сазонов С.В. и др. 2015].

## **9. Обучение специалистов референсных лабораторий первого и второго просмотра.**

9.1. Обучение специалистов осуществляется на проводимых РОП ежегодных Форумах экспертов по диагностике и лечению рака молочной железы с привлечением иностранных и отечественных ведущих специалистов: как патологов, так и клиницистов в том числе и использованием интерактивных технологий обучения с выдачей сертификата об участии в мероприятии системы НМО и начислением баллов.

9.2. Непрерывное обучение и повышение квалификации специалистов из референсных лабораторий осуществляется на сертификационных курсах РАПО г. Москва (зав. кафедрой — академик РАН, профессор Франк Г.А.) с выдачей удостоверения установленного образца и сертификата специалиста.

9.3. Обучение специалистов на рабочем месте (врача или лаборанта-гистолога из референсной лаборатории первого просмотра в региональной референсной лаборатории второго просмотра или Центральной референсной лаборатории).

## **10. Проведение научных исследований в рамках Проекта.**

10.1. Участие в профильных научных конференциях с докладами о основных достижениях исследовательской работы в референсной лаборатории.

10.2. В 2015 г. запущен пилотный проект по изучению роли стволовых клеток в реализации внутриклеточных механизмов регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза опухолевых стволовых клеток на модели карциномы молочной железы [Бриллиант А.А. и др, 2016, 2017, Brilliant A.A. et al., 2015, 2016, 2017, 2018].

10.3. Исследование внутриклеточных механизмов регуляции процессов межклеточного взаимодействия и развития эпителио-мезенхимального перехода опухолевых клеток при метастазирова-

нии [Засадкевич Ю.М. и др., 2015, 2016, Арутюнян Е.В. и др., 2015, 2016, Бриллиант Ю.В. и др., 2017, Kazanceva N.V., et al. 2016, 2017 ].

#### **4.5. Основные шаги по улучшению качества проведения иммуногистохимических исследований в лабораториях первого просмотра материала**

В результате реализации проекта РОП 2008-2016 гг. определены основные шаги по улучшению качества проведения иммуногистохимических исследований в лабораториях первого просмотра материала:

1. Необходимо более активное внедрение в работу ИГХ лабораторий первого просмотра, входящих в референс-систему автоматизированного оборудования для проведения исследований;

2. Использование в лабораториях первого просмотра валидированных ИГХ наборов, рекомендованных FDA для проведения исследований на автостейнерах;

3. Создание в ИГХ лабораториях базы контрольных образцов (блоков и стекол ИГХ) тестирования HER 2 с уровнями экспрессии: 0/1 — (HER2-отрицательный), 2 — (HER2-неопределенный), 3 — (HER2-положительный);

4. Достижение ИГХ лабораториями первичного и вторичного просмотра контрольных цифр распределения уровней экспрессии при проведении HER2 тестирования РМЖ — ориентировочно: при уровне экспрессии 1 — 10%, 2 — 10%, 3 — 16%;

5. Разработка и внедрение в работу патологоанатомических лабораторий, выполняющих ИГХ исследования системы контроля качества патологоанатомических исследований. Обязательное прохождение лабораториями добровольной сертификации на соответствие качества выполняемых иммуногистохимических исследований в Российской системе добровольной сертификации с получением соответствующего Сертификата соответствия и Разрешения на проведение ИГХ исследований.

6. Необходимо, чтобы контрольный образец ткани опухоли у всех пациенток с РМЖ тестировался либо на экспрессию белка HER2 (методикой ИГХ), либо на экспрессию гена HER2 (методикой ISH) с использованием валидированного теста;

7. Необходимо, чтобы в своей работе лаборатория, осуществляющая ИГХ диагностику, руководствовалась стандартами, принятыми профессиональным сообществом (в Российской Федерации — Экс-

пертной группой Российского общества патологоанатомов), прошла первичную валидацию методики тестирования (прошла процедуру добровольной Сертификации проводимых в лаборатории ИГХ исследований), осуществляла постоянный внутренний контроль качества и постоянное внешнее тестирование (референс), а так же обеспечивала рутинный периодический внутри лабораторный контроль.

**В работе лабораторий, занимающихся HER2 тестированием РМЖ, следует руководствоваться обновленными рекомендациями ASCO/CAP [Wolff A.C., et al., 2007]:**

1. Результаты HER2-тестирования следует считать положительными, если:

- а) получен положительный результат ИГХ 3+; или
- б) получен положительный результат ISH.

При этом имеется отсутствие патоморфологических несоответствий полученного результата.

2. Результаты HER2 тестирования следует считать неопределенными и необходимо провести тестирование с использованием альтернативной методики (или направить в региональную референс-лабораторию), если:

- а) получен неопределенный результат ИГХ 2+; или
- б) получен неопределенный результат ISH.

Подразумевается отсутствие очевидных патоморфологических несоответствий. Встречаются редкие гистологические варианты рака молочной железы (опухоли железистой структуры, микропапиллярный рак), демонстрирующие интенсивное, но неполное базолатеральное окрашивание при ИГХ и амплификацию HER2. Такие случаи так же должны быть расценены как неопределенные.

3. Результаты HER2-тестирования следует считать как отрицательные, если один или все тесты, выполненные на образце опухоли демонстрируют:

- а) отрицательный результат ИГХ0/1;
- б) получен отрицательный результат ISH.

При этом отсутствуют очевидные патоморфологические несоответствия.

4. Результаты HER2-тестирования следует считать не подлежащими оценке, если по техническим причинам невозможно охарактеризовать результаты одного или обоих методов (ИГХ и ISH) как положительные, отрицательные или неопределенные. Данная ситу-



ация может возникнуть при неадекватной обработке образцов (в соответствии с утвержденным РОП протоколом).

Еще раз подчеркивается, что время до фиксации (холодовой ишемии) биопсийного материала не должно превышать 1 час, время фиксации в 10% нейтральном забуференном растворе формалина — должно составлять от 6 до 72 часов). Последующая обработка, окрашивание, исследование должны проводиться в соответствии с рекомендованными к использованию валидированными протоколами.

#### **4.6. Наиболее распространенные ошибки лабораторий первого просмотра, выявленные при внедрении системы референсных исследований**

Наиболее распространенные ошибки лабораторий первого просмотра при организации работы в рамках референсной системы:

1. Не в полном объеме направляются на референс-исследование 2+ случаи (должны составлять около 10% от всех случаев).

2. Не в полном объеме используются возможности пересмотра каждого 10 случая для лаборатории с объемом ИГХ исследований РМЖ до 250 исследований в год и каждого 20 случая свыше этого количества.

3. Неудовлетворительно заполняется сопроводительная документация (не указывается: возраст пациентки, стадия, дата проведения исследования, результат ИГХ исследования лаборатории первого просмотра).

4. При направлении материала на референсное исследование используется бланк направления неустановленной формы.

В работе лабораторий молекулярно-биологических исследований патологоанатомических отделений, относящихся к референсной системе следует руководствоваться основными положениями, сформулированными ASCO/CAP:

1. Необходимо использование стандартизованных процедур обработки материала.

2. Необходимо использование стандартизованных (валидированных) методов проведения молекулярно-биологических исследований.

3. Необходим внешний контроль качества проводимых исследований. Лаборатория должна добиваться не менее чем 95% конкордантности (совпадения) с позитивными и негативными случаями,

прошедшими через референс-лабораторию.

4. Для обеспечения оптимальной работы лаборатории молекулярно-биологических исследований рекомендуемое количество исследований в год должно составлять не менее: для ИГХ — 250 исследований, для ISH — 100 исследований.

5. Необходим внутренний контроль качества в лаборатории молекулярно-биологических исследований. Применение положительных и отрицательных контролей для каждого ИГХ исследования.

6. Необходим обязательный периодический тренинг врачей-патологоанатомов и лаборантов гистологов.

7. Необходимо внедрение в патологическую анатомию автоматизированных методов анализа изображения и телепатологии.

### **Заключение**

При создании и правильном использовании референсной лаборатории второго просмотра для лабораторий первого просмотра значительно расширяются диагностические возможности. Становятся доступными дополнительные диагностические и сопутствующие методы, которые могут значительно улучшить диагностику, и, опосредованно прогноз течения рака молочной железы. Участвуя в системе референсных исследований, пересмотре материала, лаборатория первого просмотра материала автоматически включается, становится элементом системы качества проведения патологоанатомических, иммуногистохимических и молекулярно-биологических исследований. Постоянный внутри лабораторный контроль качества проводимых исследований является одним из наиболее важных факторов, гарантирующих качество работы отдельной взятой лаборатории. Система внешнего контроля качества дает возможность объективно оценить результаты работы разных лабораторий, определить причину выявленных несоответствий и дать рекомендации по их устранению.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Ю.Ю., Москвина Л.В., Березина Т.А., Подберезина Ю.Л., Локтев С.С., Франк Г.А. Методика исследования операционного материала при раке молочной железы после неоадьювантной терапии для оценки остаточной опухолевой нагрузки (по системе RCB). Архив патологии. 2016; 78(2): 41-46.
2. Арутюнян Е.В., Бриллиант А.А., Новикова Е.А., Сазонов С.В. Некоторые закономерности экспрессии иммуногистохимических маркеров на клетках карциномы молочной железы. Уральский медицинский журнал. 2014, 2 (116), 5-8.
3. Арутюнян Е.В., Новикова Е.А., Сазонов С.В. Анализ корреляции между экспрессией основных маркеров карциномы молочной железы и экспрессией топоизомеразы  $\text{Pa}$ . Успехи молекулярной онкологии. 2015, 4 (2), 80-81.
4. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Трансформация рецепторного статуса в группах пролиферативной активности карцином молочной железы // Сборник научных работ «Клеточные технологии - практическому здравоохранению», Екатеринбург, 2012, ИМКТ, Изд-во Астер С. 66-74.
5. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Связь рецепторного статуса клеток инфильтративной карциномы с уровнем пролиферативных процессов// The Journal Malignant Tumours, 2012, T.2, №2.P. 134.
6. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Изменение рецепторного статуса в группах пролиферативной активности карцином молочной железы// Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013. №1. С.61-63.
7. Бриллиант А.А., Сазонов С.В., Демидов С.М. Особенности экспрессии Estrogen и Progesterone Receptor на клетках HER2 neu+ карциномы молочной железы// Вестник Уральской медицинской академической науки. 2008. №6. С.57-58.
8. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Особенности распределения опухолевых стволовых клеток при иммуногистохимических подтипах инфильтративных карцином молочной железы. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием: «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва, 6-7 апреля 2016 г. С. 30-31.
9. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Стволовые опухолевые клетки и Noich-1 рецептор в «Basal-like» и «HER2 гиперэкспрессированных» инфильтративных карциномах молочной железы. II Петербургский онкологический форум «Белые ночи». Санкт-Петербург,

22-24 июня 2016 г. Сборник тезисов. С.380-381.

10. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Особенности васкуляризации карциномы молочной железы // Ангиология и сосудистая хирургия, 2012, Т.141, №3, С. 28.

11. Бриллиант А.А., Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Особенности пролиферации карцином молочной железы положительных по экспрессии HER2 пеп и с амплификацией гена HER2// Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 19-22 марта 2013 г. С. 51-52.

12. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Особенности пролиферативной активности стволовых опухолевых клеток ALDH (3+) случаев базальноподобного рака молочной железы. Российский медико-биологический вестник. 2016, 2, 26-27.

13. Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М. Сазонов С.В. Индекс Ki-67 в иммуногистохимических подтипах инвазивного рака молочной железы. Злокачественные опухоли. 2016, 4 (21), Спецвыпуск 1. 248-249.

14. Бриллиант Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Эпителиальные кадгеринины и ассоциированные с ним молекулы при инвазивном дольковом раке молочной железы. Архив патологии. 2017, 1 (79), 12-18.

15. Введение в молекулярную диагностику. Руководство в 2 томах./ Под ред. М.А. Пальцева. – Медицина, 2010. – 368 с.

16. Галахин К.А., Курик Е.Г. Лечебный патоморфоз злокачественных опухолей пищеварительного тракта. Киев. 2000. Книга-плюс, 176 с.

17. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как фактор прогноза при раке молочной железы// Практическая онкология. 2002. Т.3. №1. С.38-44.

18. Демидов С.М., Демидов Д.А., Ефремов А.А., Сазонов С.В. Усовершенствование вторичной профилактики рака молочной железы, основанной на оценке иммуногистохимических особенностей процессов с крайней степенью дисплазии// Материалы IX Международная конференция «Проблемы диагностики и лечения рака молочной железы», Санкт-Петербург, 2012, С.83-84.

19. Завалишина Л.Э. Франк Г.А. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы. – М.: Медиа Медика, 2010, - 64 с.

20. Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Рязанцева А.А., Франк Г.А. Методические рекомендации по проведению HER2-тестирования

рака молочной железы. Архив патологии. Приложение. 2011. М., Медицина, 24 с.

21. Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Молекулы клеточной адгезии как биомаркеры прогноза рака молочной железы// Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 19-22 марта 2013 г. С.78-79.

22. Засадкевич Ю.М., Сазонов С.В. Роль молекулы клеточной адгезии Е-кадгерина в онтогенезе человека в норме и патологии. Морфология. 2014, 5 (146), 78-82.

23. Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Роль кадгеринов в норме и при развитии рака молочной железы. Архив патологии. 2015, 3 (77), 57-64.

24. Конышев К.В., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Изменение экспрессии рецепторов клетками карциномы молочной железы при метастазировании в региональные лимфоузлы// The Journal Malignant Tumours, 2012, T.2, №2. P. 132.

25. Конышев К.В., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Экспрессия рецепторов к стероидным гормонам в региональных метастазах карциномы молочной железы// Материалы 4 Всероссийского съезда патологоанатомов, Белгород, 2013, С.349-351.

26. Консенсус по итогам Совещания исследователей в рамках программы ML 19870 «Эпидемиологическая программа скрининга HER2-статуса у пациенток с раком молочной железы». Российское общество патологоанатомов. Москва. 11 октября 2015 г. 18 с.

27. Криволапов Ю.А., Пешков М.В., Леенман Е.Е. и др. Первый опыт проведения внешнего контроля качества иммуногистохимических исследований в диагностике лимфопролиферативных заболеваний// Архив патологии, 2011. – Том 73, №2. – С. 25-32.

28. Лавникова Г.А. Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли. Москва. 1979. Методические рекомендации, 13 с.

29. Леонтьев С.Л., Сазонов С.В. Создание системы пересмотра иммуногистохимических исследований при диагностике рака молочной железы. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012, 1 (38), 18-22.

30. Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Опыт работы референс-лаборатории по HER2/neu тестированию карциномы молочной железы в Свердловской области// Сборник научных работ «Клеточные технологии - практическому здравоохранению», Ека-

теринбург, 2012, ИМКТ, Изд-во Астер С. 55-66.

31. Лушников Е.Ф. Терапевтический патоморфоз опухолей человека в практическом и теоретическом аспектах. Вестник АМН СССР, 1976; 6: 7-12.

32. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015, 4 (59), 82-86.

33. Огнерубов Н.А. Неоадьювантная терапия местно-распространенного рака молочной железы. Автореф.дисс. докт.мед. наук. Москва. 1992. 45 с.

34. Пальцев М.А., Франк Г.А., Мальков П.Г. Стандартные технологические процедуры при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала// Архив патологии. – 2011. - №3 (Приложение). 112 с.

35. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Руководство в двух томах. Под ред. Н.А. Краевского, А.В. Смольяникова. М.: Медицина, 1993; Т1: 560 с.

36. Петкау В.В., Булавина И.С., Сакаева Д.Д., Страхова Н.В., Сазонов С.В. Возрастные особенности рака молочной железы// Уральский медицинский журнал. 2012. №4. С.24-26.

37. Пожариский К.М., Кудайбергенова А.Г., Савёлов Н.А., Гриневич В.Н., Сазонов С.В. Методические рекомендации «Патологоанатомическое исследование инвазивного рака молочной железы». Институт медицинских клеточных технологий. 2014. 26 с.

38. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – 4-е изд., доп. и перераб./ Под ред. С.В.Петрова, Н.Т.Райхлина. – Казань, 2012. – 624 с.

39. Руководство по интерпретации HER2-статуса рака молочной железы и желудка иммуногистохимическим методом с использованием кроличьих моноклональных антител VENTANA HER2 (4B5)/ Под ред. акад. РАМН, проф. Г.А. Франка, Roche. - 28 с.

40. Сазонов С.В. ИГХ диагностика рака молочной железы. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2013.

41. Сазонов С.В. Особенности работы системы внешнего контроля качества иммуногистохимической диагностики рака молочной железы в Уральском федеральном округе (референс) в 2014 г. Вестник уральской медицинской академической науки. 2015, 4 (55), 15-19.

42. Сазонов С.В. Организация системы внешнего контроля ка-

чества иммуногистохимической диагностики рака молочной железы в Уральском федеральном округе (референс). Уральский медицинский журнал. 2015, 1 (124), 153-158.

43. Сазонов С.В. Итоги реализации внешнего контроля качества иммуногистохимической диагностики рака молочной железы в Уральском федеральном округе (референс) в 2015 г. Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека», Челябинск, 18-19 марта 2016 г. С.98-102.

44. Сазонов С.В., Бриллиант А.А. Состояние пролиферативных процессов в клетках внутритротоковой карциномы молочной железы// Сборник научных трудов VIII Всероссийской конференции по патологии клетки, 11-12 ноября 2010, Москва, С. 43-47.

45. Сазонов С.В., Бриллиант А.А. Процесс ангиогенеза и пролиферативная активность инфильтративной карциномы молочной железы// Ангиология и сосудистая хирургия, Т.18, 2012, С.34.

46. Сазонов С.В., Бриллиант А.А. Иммуногистохимическое исследование пролиферативных процессов на клетках HER2 некарциномы молочной железы// Аллергология и иммунология, 2011, Т.12, №1. С. 108.

47. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М. Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток карциномы молочной железы. Гены и клетки. 2017, 12 (4), 76-81.

48. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Демидов С.М. Особенности экспрессии рецепторов на клетках карциномы молочной железы при определении показаний к иммунотерапии герцептином// Аллергология и иммунология, 2009, Том 10, №1. С.65.

49. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Демидов С.М., Дорофеев А.В., Ситулина О.О., Арутюнян Е.В. Результаты работы референс-лаборатории по HER2-неу тестированию карциномы молочной железы в УрФО за 2009 г.// Уральский медицинский журнал, №12 (77), 2010, С.133-138.

50. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Дорофеев А.В., Демидов С.М. Некоторые закономерности экспрессии Estrogen, Progesterone Receptor и Ki-67 на опухолевых клетках карциномы молочной железы// Уральский медицинский журнал, №12 (77), 2010, С.68-72.

51. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Ситулина О.О. Схема пересмотра материала (референс) больных раком молочной железы. Па-



тент на промышленный образец №80506 от 16 декабря 2011 г.

52. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Леонтьев С.Л. Иммуногистохимические закономерности экспрессии Estrogen, Progesterone Receptor и Ki67 на опухолевых клетках карциномы молочной железы// Аллергология и иммунология, Т.13, №1, 2012, С.85.

53. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Ситулина О.О. Схема пересмотра материала (референс) больных с раком молочной железы// Патент RUS 80506 07.02.2011.

54. Сазонов С.В., Демидов С.М. Иммуногистохимическое выявление микрометастазов в региональных лимфоузлах при раке молочной железы// Тезисы докладов 10 Международной конференции «Иммунология гемопоза», Москва, 2013, С. 172-173.

55. Сазонов С.В., Демидов С.М., Дорофеев А.В., Ситулина О.О., Арутюнян Е.В. Результаты работы референс-лаборатории по HER2-пеп тестированию карциномы молочной железы в УрФО за 2009 г. Уральский медицинский журнал. 2010, 12 (77), 133-138.

56. Сазонов С.В., Засадкевич Ю.М., Леонтьев С.Л. Роль эпителиальных E- и P-кадгеринов в реализации внутриклеточных механизмов регуляции опухолевого роста. Екатеринбург, 2016.

57. Сазонов С.В., Конышев К.В., Казанцева Н.В., Токарева М.В., Бриллиант Ю.М. Гистологические и иммуногистохимические проявления эпителио-мезенхимального перехода при тройномнегативном раке молочной железы. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2016, № 2, 53-63. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Организация работы системы пересмотра материала пациенток с карциномой молочной железы (референс). Уральский медицинский журнал. 2014, 2 (116), 70-78.

58. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Система референсной диагностики рака молочной железы в Уральском федеральном округе. Материалы Всероссийской конференции молодых специалистов «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии». Рязань, 05-07 октября 2017 г. С. 182-184.

59. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Опыт работы референс-лаборатории по HER2 пеп тестированию карциномы молочной железы в Свердловской области// Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013. №1. С.56-60.

60. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Результаты работы референс-лаборатории по HER2 пеп тестированию карциномы молочной железы в УрФО в 2011 г.// Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. Т.4., №37. С.7-11.

61. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Опыт организации работы референс-лаборатории по HER2 тестированию рака молочной железы в УрФО// Материалы 4 Всероссийского съезда патологоанатомов, Белгород, 2013, С.395-398.
62. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Результаты работы референс-лаборатории по HER2 нец тестированию карциномы молочной железы в УрФО в 2011 г. Вестник уральской медицинской академической науки. 2011, 4 (35), 7-11.
63. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Опыт работы референс-лаборатории по HER2/нец тестированию карциномы молочной железы в Свердловской области. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013, 1 (43), 56-60.
64. Сазонов С.В., Леонтьев С.Л., Бриллиант А.А. Опыт организации работы референс-лаборатории по HER2 тестированию рака молочной железы в УрФО. Материалы 4 Всероссийского съезда патологоанатомов. Белгород. 2013. С.395-398.
65. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Манихас А.Г. и др. Клинические рекомендации РООМ по диагностике и лечению рака молочной железы. Клинические рекомендации РООМ. Санкт-Петербург. Издательский дом «АБВ-пресс». 2015. 504 с.
66. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Манихас А.Г. и др. «Золотой стандарт» диагностики и лечения рака молочной железы. Клинические рекомендации РООМ. Санкт-Петербург. Издательский дом «АБВ-пресс». 2016. 448 с.
67. Солоницына Л.А., Леонтьев С.Л., Сазонов С.В. Механизм реализации права на информацию и ее защиту при проведении референс-исследований у пациенток с РМЖ// The Journal Malignant Tumours, 2012, Т.2, №2. Р.138-139.
68. Солоницына Л.А., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Механизм реализации права на информацию и ее защиту при проведении референс-исследований у пациенток с РМЖ The Journal Malignant Tumours. 2012, 2 (2), 138-139.
69. Солоницына Л.А., Сазонов С.В., Леонтьев С.Л. Обеспечение прав пациентов на информацию и ее защиту при проведении референс-исследований карциномы молочной железы. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013, 1 (43), 15-17.
70. Солоницына Л.А., Сазонов С.В., Демидов С.М., Леонтьев С.Л. Организация системы контроля качества оказания медицинской помощи при иммуногистохимической диагностике рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2014,

№ 4, Спецвыпуск. С. 112-113.

71. Солоницына Л.А., Сазонов С.В., Демидов С.М., Леонтьев С.Л. Правовое обеспечение системы качества оказания медицинской помощи при диагностике и лечении злокачественных новообразований молочной железы. Вестник Российского общества онкомаммологов. Спецвыпуск. 2015, С. 90-91

72. TNM: Классификация злокачественных опухолей. 7-й пересмотр./ Под ред. Собина ЛХ и др.; пер. с англ. и научн. ред. А.И. Щёголев, Е.А. Дубова, К.А. Павлова. 2011. 172 с.

73. Франк Г.А., Андреева Ю.Ю., Виноградов И.Ю., Гладко С.Б., Горелик М.З., Завалишина Л.Э., Леенман Е.Е., Мационис А.Э., Петров С.В., Сазонов С.В. 10 лет тестирования HER2 статуса рака молочной железы в России// Архив патологии. 2012. Т.74. №5. С.3-6.

74. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы и желудка. Методические рекомендации и атлас// Архив патологии. 2013. Т.75, В.2. 64 с.

75. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Пожарисский К.М. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей. М.: Практическая медицина. 2014.

76. Франк Г.А., Илатовская М.Е., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. Роль и критерии оценки морфологического регресса рака молочной железы после неoadьювантной терапии. Современная онкология. 2015; 17(2): 30-34.

77. Франк Г.А., Мальков П.Г., Мещерякова Н.Г. Контроль качества морфологической диагностики опухолей по результатам школы патоморфологии портала Oncology.ru// Архив патологии, 2011. – Том 73, №2. – С. 32-35.

78. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной медицине. Екатеринбург. 2016.

79. Aas T., Geisler S., Eide G.E. et al. Predictive value of tumor cell proliferation in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. Eur J Cancer. 2003. № 39 (4). P. 438-446.

80. Allred D., Harvey H.M., Berardo M.D., et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis// Mod. Pathol., 1998 – N11 – P.155–168.

81. Andea A.A., Wallis T., Newman L.A., Bouwman D., Dey J., Visscher D.W. Pathologic analysis of tumor size and lymph node status in multifocal/multicentric breast carcinoma. Cancer. 2002; 94: 1383-

1390.

82. Anderson B.O., Shyyan R., Eniu A.E., et al. Breast cancer in limited-resource countries: an overview of the Breast Health Global Initiative 2005 guidelines // *Breast J.* 2006 - N12 (suppl. 1) – P. 3-26.

83. Apple S.K., Suthar F. How do we measure a residual tumor size in histopathology (the gold standard) after neoadjuvant chemotherapy? *Breast.* 2006;15(1):370–6.

84. Bilous M., Dowsett M., Hanna W. et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod. Pathol.* 2003; 16(2): 173-82.

85. Bossuyt V., Provenzano E., Symmans W. et al. Recommendation for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. *Ann.Oncol.* 2015; 26(7): 1280-91.

86. Bouzourene H., Bosman F.T., Seelentag W. et al. Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. *Cancer.* 2002; 94 (4): 1121-1130.

87. Brilliant A.A., Zasadkevich Y.M., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas// *European Journal of Cancer (EJC)*, 2013, Vol. 49, Supp.2, S.216.

88. Brilliant A., Zasadkevich Y., Sazonov S. Features of vimentin and Ki67 expression in basal-like breast cancer// *The European Journal of Pathology Virhows Archiv*, 2013. V.463, N2, P.250.

89. Burcombe R.J., Makris A., Richman P.I. et al. Evaluation of ER, PgR, Her-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2005; 92(1):147-55.

90. Carey L.A., Metzger R., Dees E.C. et al. American Joint Committee in Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005; 97(15): 1137-42.

91. Carter C.L., Allen C., Henson D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases // *Cancer*, 1989 – N 63 - P. 181–187.

92. Chaiwun B., Settakorn J., Ya-In C., Wisedmongkol W., Rangdaeng S., Thorner P. Effectiveness of fine-needle aspiration cytology of the breast: analysis of 2,375 cases from northern Thailand// *Diagn. Cytopathol.* - 2002, N26 – P. 201–205.

93. Chang H. Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer*. 2010; 116(12): 2856-67.

94. Chollet P., Amat S., Cure H. et al. Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2002. 86 (7): 1041-1046.

95. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol*. 1997; 17: P. 2639-48.

96. Cocquyt V.F., Blondeel P.N., Depypere H.T. et al. Different responses to preoperative chemotherapy for invasive lobular and invasive ductal breast carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*. 2003. № 29. P. 361-367.

97. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGC receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 2005; 230: P. 1132-9.

98. Cristofanili M., Gonzalez-Angulo A., Sneige N. et al. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *Journal of Clinical Oncology*. 2005. № 23. P. 41-48.

99. Daidone M.G., Veneroni S., Benini E. et al. Biological markers as indicators of response to primary and adjuvant chemotherapy in breast cancer. *International Journal of Cancer*. 1999. № 84. P. 580-586.

100. De Placido S, Carlomagno C, De Laurentiis M, Bianco AR. C-erbB2 expression predicts tamoxifen efficacy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, 52: P.55-64.

101. Di Augustine RP, Richards RG, Sebastian J. EGF-related peptides and their receptors in mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2009, 2: P. 109-17.

102. *Diagnostic Immunohistochemistry*. Third edition/ Ed. Prof. David J. Dabbs. Philadelphia, PA, Saunders. 2010. 942 P.

103. Fisher E.R., Wang J., Bryant J. Pathobiology of preoperative chemotherapy: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel (NSABP) protocol B-18. *Cancer*. 2002. № 95. P. 681-695.

104. Frank G., Andreeva J., Zavalishina L., Matsionis A., Plotko S., Gorelik M., Vinogradov I., Sazonov S. HER2 testing in Russia: The results of the 10 years of experience. *ASCO/CAP recommended score system// Wirchows Archiv*, 2012. № 461 (Suppl 1), P.241-242.

105. Fritschy J.M. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – Vol.28. –

P.2365 – 2370.

106. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N. Engl. J. Med.*- 2006.- 354 – P. 809–20.

107. Eniu AE, Carlson RW, Aziz Z, et al. Breast cancer in limited-resource countries: treatment and allocation of resources// *Breast J.* – 2006, N 12 (suppl. 1) - P. 38–53.

108. Eisenhauer E.A., Therasse P., Bogaerts J. et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, 2009. 45: 228-247

109. Elston C.W., Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. 1. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19: 403-410.

110. Esposito A., Criscitiello C., Curigliano G. Highlights from the 14th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast cancer. *Ecancer medical science*. 2015; 9: 518-29.

111. Hammond M.E., Hayes D.F., Wolff A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of oncology practice*. 2010; 6(4): 195-7.

112. Hamy-Petit A.S., Belin L., Bonsang-Kitzis H., et al. Pathological complete response and prognosis after neoadjuvant chemotherapy for HER2-positive breast cancers before and after trastuzumab era: results from a real-life cohort. *British Journal of Cancer*. 2016; 114: 44-52.

113. Hicks M., Macrae E., Abdel-Rasoul M., et al. Neoadjuvant dual HER2-targeted therapy with lapatinib and trastuzumab improves pathologic complete response in patients with early stage HER2-positive breast cancer: a meta-analysis of randomized prospective clinical trials. *Oncologist*. 2015; 20(4): 337-343.

114. Hoda S.A., Rosen P.P. Practical considerations in the pathologic diagnosis of needle core biopsies of breast// *Am. J. Clin. Pathol.* - 2002, N 118, P. 101–108.

115. Green F., Page D., Fleming I., et al., *AJCC Cancer Staging Manual*, 6 th ed. New York: Springer, - 2002, N 2 - P. 221–240.

116. Kaufmann M., Hortobagyi G.N., Goldhirsch A. et al. Recommendations from an international expert panel on the use of

neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *Journal of Clinical Oncology*. 2006. № 24. P. 1940-1949.

117. Konyshov K., Brilliant A., Sazonov S. Discordance of Estrogen and Progesterone receptor expression between cells of primary lesions and locoregional metastases in breast cancer// *The European Journal of Pathology Virhows Archiv*, 2013. V.463, N2, P.259.

118. Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, et al. Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* - 2004; 96 – P. 1141–51.

119. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. (Ed.): *WHO Classification of Tumours of the Breast*. IARC: Lyon. 2012.

120. Lannin D.R., Silverman J.F., Walker C., Pories W.J. Cost-effectiveness of fine needle biopsy of the breast// *Ann. Surg.* – 1986, N 203 – P. 474-480.

121. Logan-Young W., Dawson A.E., Wilbur D.C., et al. The cost-effectiveness of fine-needle aspiration cytology and 14-gauge core needle biopsy compared with open surgical biopsy in the diagnosis of breast carcinoma// *Cancer*, 1998 - N 82, P. 1867–1873.

122. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin. Cancer Res.* - 2005; 11 – P. 4393–9.

123. Masood S. The expanding role of pathologists in the diagnosis and management of breast cancer: worldwide excellence in breast pathology program// *Breast J.*, 2003 – N. 9(suppl. 2)- P. 94–97.

124. Menard S, Valagussa P, Pilotti S, et al. Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J. Clin. Oncol.* - 2001; 19 – P. 329–35.

125. Meunier M., Clough K. Fine needle aspiration cytology versus percutaneous biopsy of nonpalpable breast lesions// *Eur. J. Radiol.* 2002, - N 42 – P. 10–16.

126. Miller I.D., Payne S., Ogston K.N. A new histological grading system to assess response of breast cancer to primary chemotherapy. *Int. J. Oncol.* 2002. № 20 (4). P. 791-796.

127. Minckwitz G., Untch M., Blohmer J.U., et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 1796-1804.

128. Quiet C.A., Ferguson D.J., Weichselbaum R.R., Hellman S. Natural history of node positive breast cancer: the curability of small



cancers with a limited number of positive nodes// J. Clin. Oncol., 1996 – N. 14 – P. 3105–3111.

129. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. Clin. Breast Cancer - 2004; 5 - P. 63–9.

130. Page D.L., Jensen R.A., Simpson J.F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer// Br. Cancer Res. Treat., 1998 - N51 – P. 195–208.

131. Peintinger F., Sinn B., Hatzis C., et al. Reproducibility of residual cancer burden for prognostic assessment of breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. Mod. Pathol. 2015; 28 (7): 913-920.

132. Penault-Llorca F., Abrial C., Raoelfils I. et al. Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. Hum. Pathol. 2008;39:1221-8.

133. Perez E.A., Roche P.C., Jenkins R.B., et al. HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Mayo Clin. Proc. - 2002; 77 – P. 148–54.

134. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N. Engl. J. Med. - 2005; 353 – P. 1659–72.

135. Pinder S., Ellis I.O., O'Rourke S., et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large series with long-term follow-up// Histopathology, 1994 – N 24 – P. 41–47.

136. Pisano E.D., Fajardo L.L., Caudry D.J., et al. Fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable breast lesions in a multicenter clinical trial: results from the Radiologic Diagnostic Oncology Group V // Radiology, 2001 - V. 219 – P. 785–792.

137. Puglisi F., Fontanella C., Amaroso V., et al. Current challenges in HER2-positive breast cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2015. 1040-8428.

138. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. N. Engl. J. Med.- 2006; 354 – P. 2103–11.

139. Reddy J.C., Reimann J.D., Anderson S.M., et al. Concordance between central and local laboratory HER2 testing from acommunity-based clinical study. Clin. Breast Cancer - 2006; 7 – P. 153–7.

140. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* - 2005; 353 – P. 1673–84.

141. Rouzier R., Mathieu M.C., Llombart-Cussac A. et al. The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. *European Journal of Cancer.* 2004. № 40. P. 342-351.

142. Ross JS, Fletcher JA. The Her-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Semin. Cancer. Biol.* - 1999; 9 – P. 125–38.

143. Rubbia-Brandt L., Giostra E., Brezault C. et al. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann. Oncol.* 2007; 18 (2): 299-304.

144. Sahoo S., Lester S.C. Pathology of breast carcinomas after neoadjuvant chemotherapy. An overview with recommendations on specimen processing and reporting. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133: 633-642.

145. Sarkaria I., Rizk N., Bains M. et al. Post-treatment endoscopic biopsy is a poor-predictor of pathologic response in patients undergoing chemoradiation therapy for esophageal cancer. *Ann. Surg.* 2009; 249: 764-767.

146. Sazonov S., Brilliant A., Brilliant Y. Proliferation of cancer cells in triple negative breast cancer. *The Breast Journal.* 2017, S1. p. 29.

147. Sazonov S.V., Leontiev S.L., Brilliant A.A. Immunohistochemical expression patterns of Estrogen, Progesterone Receptor and Ki67 in tumor cells of breast carcinoma// *International Journal on Immunorehabilitation*, V.14, N1.2012, P.24.

148. Schott A.F., Roubidoux M.A., Helvie M.A. et al. Clinical and radiologic assessments to predict breast cancer pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2005. 92 (3): 231-238.

149. Shimosato Y., Oboshi S., Baba K. Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemo-therapy for carcinomas. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1971. 1: 19-35.

150. Schwartz G.F., Lagios M.D., Carter D., et al. Consensus conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Cancer.* 1997; 80: 1798-1802.

151. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy

plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* - 2001; 344 – P. 783–92.

152. Sobin L.H., Wittekind C., eds. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th ed. New York: John Wiley & Sons, 2002.

153. Symmans W.F., Peintinger F., Hatzis C. et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(28):4414-22.

154. Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J. Nat. Cancer Inst.* 1998 – V. 90 – P. 1346–60.

155. Therasse P., Arbuck S.G., Eisenhauer E.A. et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000. 92 (3): 205-216.

156. Terry J., Torlakovic E.E., Garratt J. et al. Implementation of a Canadian external quality assurance program for breast cancer biomarkers: an initiative of Canadian Quality Control in immunohistochemistry (cIQc) and Canadian Association of Pathologists (CAP) National Standards Committee/ Immunohistochemistry// *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* – 2009. – Vol. 17. – P. 375-382.

157. Vargas H.I., Vargas M.P., Gonzalez K.D., et al. Diagnosis of palpable breast masses: ultrasound-guided large core biopsy in a multidisciplinary setting// *Am. Surg.*, 2004 - V. 70 – P. 867–871.

158. Veronesi S.M., Gambacorta M., Gottardi O., et al. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer// *Cancer*, 1993 - V. 71 – P. 3926–3931.

159. Vincent-Salomon A., Rousseau A., Jouve M. et al. Proliferation markers predictive of the pathological response and disease outcome of patients with breast carcinomas treated by anthracycline-based preoperative chemotherapy. *Eur. J. Cancer.* 2004. № 40 (10). P. 1502-1508.

160. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*- 2002; 20 - P.719–26.

161. Vyberg M., Torlakovic E., Seidal T. et al. Nordic immunohistochemical quality control// *Croat. Med. J.* – 2005. – Vol. 46. – P.368-371.

162. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signaling

network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2001; 2 - P.127–37.

163. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004 - V. 291 - P.1972–7.

164. Yu Z., Ye S., Hu G. et al. The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy. *Future Med. Chem.* 2015; 7(3): 269-89.

165. Zasadkevich Y.M., Brilliant A.A., Sazonov S.V. Characteristics of the relation between epithelial-mesenchymal transition and proliferative activity in breast carcinomas. *European Journal of Cancer.* 2013. P. 216Zarbo R.J., Hammond M.E. Her-2/neu testing of breast cancer patients in clinical practice. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003 - V.127 - P.549–53.

166. WHO Classification of Tumor of the Breast. 4th edition. Ed. by Lakhani S., Ellis I.O., Schnitt S., Tan P., van de Vijver M. Lyon, 2012. p. 8.

167. World Health Organization. Executive summary. In: *National Cancer Control Programmes: Policies and Managerial Guidelines.* Geneva. Switzerland: World Health Organization, 2002:i–xxiv.

168. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer// *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2007. – Vol.131. – P.18-43.

169. Wolmark N., Wang J., Mamounas E. et al: Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: Nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2001. P. 96-102.

## Приложения:

### 1. Форма направления на ИГХ референс-исследование:

#### НАПРАВЛЕНИЕ

на иммуногистохимическое референс-исследование РМЖ

Ф.И.О. пациента \_\_\_\_\_

Год рождения \_\_\_\_\_ г.

Диагноз \_\_\_\_\_ по T N M

№ блоков \_\_\_\_\_

Проведенное лечение до операции: \_\_\_\_\_

Направляющее учреждение: \_\_\_\_\_

Провести исследования с использованием следующих антител (отметить):

Estrogen Receptor	Progesterone Receptor	HER2/neu	Ki67
+	+	+	+

Лечащий врач: \_\_\_\_\_ м.п.

Дата направления: \_\_\_\_\_

## 2. Форма ИГХ заключения референс-лаборатории:

<b>МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ</b> <b>Министерство здравоохранения Свердловской области</b>		
<b>ГБУЗСО «Центр организации специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»</b>  Россия, 620036, г. Екатеринбург, ул. Соболева, 25 Тел.: (343) 376-98-28 Факс (343) 376-97-83		<b>ГБОУ ВПО</b> <b>«Уральский государственный медицинский университет»</b> <b>Минздрава России</b>  Россия, 620128, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3 Тел.: (343) 231-42-64 Факс: (343) 340-63-83



### ЛАБОРАТОРИЯ ИММУНОГИСТОХИМИИ (референс-лаборатория) \* \*\*

**Пациент:** \_\_, Г.р.

**Дата исследования:** .09.2018

**№ исследования:** 0

**№ парафинового блока: №**

**Диагноз:** T-r breast

**Уважаемые коллеги!**

Иммуногистохимическое исследование выполнено на DAKO autostainer (universal staining system). Демаскировка в PTLink (Dako), условия: 40 мин. при 99°C в Target Retrieval Solution (Dako, S1699). Система визуализации: EnVision+ Dual Link System – HRP (Dako, K4061); c-erbB-2 Oncoprotein - на Ventana autostainer Benchmark XT (universal staining system) с использованием ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana).

В направленном Вами материале при иммуногистохимическом исследовании на опухолевых клетках **обнаружена экспрессия:**

<b>Estrogen Receptor</b> (Dako, Clone 1D5)	<b>Progesterone Receptor</b> (Dako, Clone PgR 636)	<b>HER2/neu</b> (антитела VENTANA HER2, clon 4B5) +	<b>Ki67</b> (Dako, Clone MIB-1)
<b>TS=</b>	<b>TS=</b>	<b>0</b>	<b>%</b>

Врач-патологоанатом Кобышев К.В.

Заведующий лабораторией,  
д.м.н., профессор Сазонов С.В.

\* - Сертификат соответствия требованиям и стандартам Системы добровольной сертификации процессов выполнения патоморфологических исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении в статусе референсной лаборатории № 4, серия ПС-01 № 0000010 от 16.12.2010 г., г.Москва

\*\* - Certificate Nordic immunohistochemical Quality Control Institute of Pathology, Aalborg Hospital, Ladegaardsgade 3, P.O.Box 561, DK-9100 Aalborg, Denmark, Participant no. 768 Laboratory (Ekaterinburg, Inst.for Med. Cell Technologies), Dept. of Pathology , 09/04/2013



### 3. Патент на структуру референса РМЖ в УрФО.





## 4. Сертификат соответствия качества проводимых исследований

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ ВЫПОЛНЕНИЯ  
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ (ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ) ИССЛЕДОВАНИЙ  
И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ УСЛУГ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

 **СЕРТИФИКАТ  
СООТВЕТСТВИЯ**

№ 4

Срок действия с 16.12.2010г. по 16.12.2015г.

Орган по сертификации  
*Автономная некоммерческая организация "Система добровольной сертификации патоморфологических исследований", расположенная по адресу: Россия 117418, г. Москва, ул. Цюрихи, д.3, тел. (495) 120-94-79*

СЕРТИФИКАТ ВЫДАН Государственному учреждению здравоохранения Свердловской области «Институту медицинских клеточных технологий» (ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»)

Лицензия на медицинскую деятельность  
№ 66-01-001393 серия ФС-1 срок до 12 мая 2016 г.

Настоящий сертификат подтверждает, что оказываемые услуги по выполнению патоморфологических (патологоанатомических) исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении соответствуют требованиям стандартам Системы добровольной сертификации процессов выполнения патоморфологических исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении в статусе референсной лаборатории по выполнению патоморфологических, морфометрических, иммуноморфологических, в том числе по иммуногистохимическому определению HER-2 рецепторов рака молочной железы

СЕРТИФИКАТ ВЫДАН НА ОСНОВАНИИ:  
акта оценки оказания услуг от " 16 " декабря 20 10 г.

 Руководитель  
Органа по сертификации  
Системы добровольной  
сертификации  
патоморфологических  
исследований

 **Солдатов С.Р.**  
подпись фамилия, инициалы

Серия **ПС-01** № **0000010 \***



## 5. Разрешение на проведение ИГХ исследований в статусе референс-лаборатории

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ ВЫПОЛНЕНИЯ  
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ (ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ) ИССЛЕДОВАНИЙ  
И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИХ УСЛУГ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

 **РАЗРЕШЕНИЕ**

Регистрационный № 4 от " 16 " декабря 20 10 г.

Орган по сертификации  
Автономная некоммерческая организация "Система добровольной сертификации патоморфологических исследований", расположенная по адресу: Россия 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3, тел. (495) 120-94-79

разрешает применение Знака соответствия Системы добровольной сертификации услуг по выполнению патоморфологических (патологоанатомических) исследований и патологоанатомических услуг в здравоохранении

Разрешение выдано Государственному учреждению здравоохранения Свердловской области «Институту медицинских клеточных технологий» (ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»)

на основании сертификата № 4

Действительно до " 16 " декабря 20 15 г.

   
подпись

Солдатов С.Р.  
фамилия, имя, отчество

Серия **ПС-01** № **0000010 \***

## 6. Международный Сертификат качества Нордик



Nordic immunohistochemical Quality Control

Institute of Pathology, Aalborg Hospital, Ladegaardsgade 3, P.O.Box 561, DK-9100 Aalborg, Denmark

### Assessment of BRISH, H3 2013 – Individual results

Participant no.	768
Laboratory	(Ekaterinburg Inst.for Med. Cell Technologies), Dept. of Pathology
Epitope	<b>HER-2 BRISH</b>
Assessment	Optimal
Comments to the protocol	-
Suggestions for improvement	-
Scoring consensus - Laboratory vs. NordIQ	Yes

NordIQ has assessed your submitted HER-2 BRISH stain. The assessment is generally based on the staining intensity and distribution in cells expected to stain, background staining, cross-reactivity, counter-staining and preservation of tissue structures. More specific criteria may be described on <http://www.nordiq.org/Assessments.htm>.

Each stained slide was marked as *optimal*, *good*, *borderline* or *poor*.

**Optimal staining:** The demonstration of HER-2/chr17 is considered perfect or close to perfect in all of the included tissues.

**Good staining:** The HER-2/chr17 ratios could be evaluated in the included tissues, but the interpretation was slightly compromised e.g., due to a weak or excessive counterstaining, excessive retrieval or similar.

**Borderline staining:** A generally too weak demonstration of the HER-2 or chr17 signals, a generally low signal-to-noise ratio or a false negative staining result in one of the included tissues. The protocol should be optimized.

**Poor staining:** A false negative staining result of several of the included tissues or a generally very low signal-to-noise ratio and/or a severely impaired morphology. An optimization of the protocol is urgently needed.

For stains assessed as borderline or poor, comments and recommendations are given to the protocols. Also a good stain may be given a comment if a specific problem is identified.

When assessed, your interpretation and scoring data were compared to the NordIQ reference scoring data. If "Scoring consensus" in your Individual results is marked "Yes", it means that your interpretation was in line with the NordIQ reference data and HER-2 status (irrespective of your staining being marked as optimal, good, borderline or poor).

Please compare the optimal stains and assessment details published on [www.nordiq.org](http://www.nordiq.org) with your own stains and protocols. Implementation of NordIQ recommended protocols as well as changes suggested in this letter must be tested carefully in your own laboratory before implementation into diagnostic work. NordIQ do not take any responsibility for consequences of changes in protocols or methods in your laboratory.

NordIQ keeps participant identity and assessment results strictly confidential

Best regards

NordIQ

[nordiq@rn.dk](mailto:nordiq@rn.dk)

### Информация об авторе:



Сазонов С.В. — заведующий кафедрой Уральского государственного медицинского университета, заместитель главного врача по науке Института медицинских клеточных технологий МЗ СО, заведующий патолого-анатомическим отделением, заведующий референсной лабораторией УрФО РФ, д.м.н., профессор, автор 425 научных публикаций, 7 монографий, 4 пособий для врачей, 2 медицинских технологий, 29 патентов.



# Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы / Ensuring the quality of molecular biological research in the diagnosis of breast cancer

Информация о монографии:

В монографии обобщен опыт работы региональной референсной лаборатории УрФО РФ по молекулярно-генетической диагностике рака молочной железы. Дана комплексная оценка процессов, влияющих на качество молекулярно-генетической диагностики рака молочной железы в патоморфологической лаборатории. Показано, что постоянный внутри лабораторный контроль качества проводимых молекулярно-генетических исследований является одним из наиболее важных факторов, гарантирующих качество работы отдельной взятой лаборатории. Система внешнего контроля качества дает возможность объективно оценить результаты работы разных лабораторий, определить причину выявленных несоответствий и дать рекомендации по их устранению. Разобраны основные шаги иммуногистохимической диагностики рака молочной железы, этапы организации работы региональной референсной лаборатории.

Издание представляет интерес для широкого круга врачей, гистологов, патологоанатомов, научных сотрудников, биологов, аспирантов, студентов медицинских вузов и биологических факультетов.

Оригинал-макет подготовлен:

Издательство ООО «Редакция журнала

“Вестник уральской медицинской академической науки”»

Россия, 620014, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 12а, офис 917

Тел./факс (343) 310-03-06

Усл.печ.л. 10. Тираж: 500

Подписано в печать 25.12.2018. Формат 60х84/16. Гарнитура Times New Roman

ISBN 978\_5\_9908479\_6\_5

\* На обложке фото Herceptest



ISBN 978-5-9908479-6-5



9 785990 847965